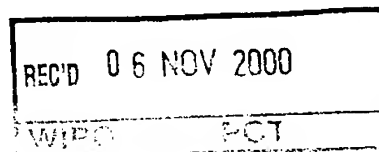


IT 00/382

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. VR99 A 000082

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

6 OTT. 2000

Roma, li

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Giovanni P. ...

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione CONSORZIO PER GLI STUDI UNIVERSITARI-
Residenza 37129 VERONA Via Dell'Artigliere 8 codice 80011060235
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome SANDRI SANDRO cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza EUROPATENT dell'Ing.S.Sandri sas
via Locatelli n. 20 città VERONA cap 37122 (prov) _____

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez. cl. sci) C12N gruppo sottogruppo 5/00

SUBSTRATO BIOARTIFICIALE PER LA REALIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI ANIMALI, IN PARTICOLARE UMANI.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) ARMATO Ubaldo
2) MIGLIARESI Claudio
3) MOTTA Antonella
4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna annotazione



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 69 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) _____
Doc. 2) 2 PROV n. tav. 21 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) _____
Doc. 3) 1 RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale _____
Doc. 4) 1 RIS designazione inventore _____
Doc. 5) - RIS documenti di priorità con traduzione in italiano _____
Doc. 6) - RIS autorizzazione o atto di cessione _____
Doc. 7) - nominativo completo del richiedente _____

8) attestati di versamento, totale lire

NOVECENTOQUINDICIMILA.

obbligatorio

COMPILATO IL 01 10 1999 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

CONTINUA SINO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

SCIoglimento RISERVE	
Data	N° Protocollo
confronta singole priorità	

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

VERONA

codice 23

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

VR99A000082

Reg. A

L'anno millenovecento

NOVANTANOVE

, il giorno

UNO

, del mese di

OTTOBRE

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE

Fabio Fiorella

timbro
dell'ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

Sesso Benedettina

VRQA 00008

10 1999

DATA DI EMISSIONE

D. TITOLO

SUBSTRATO BIOARTIFICIALE PER LA REALIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI ANIMALI, IN PARTICOLARE UMANI.

L. RIASSUNTO

Substrato adatto allo sviluppo, alla proliferazione ed alla corretta differenziazione di cellule tissutali specializzate del corpo umano, costituito da un materiale biocompatibile e biorassorbibile in tempi determinabili, per l'ottenimento di una integrazione completa del tessuto trapiantato e di una integrazione ottimale con gli altri sistemi cellulari e con le loro funzioni nell'organismo nel quale il trapianto o l'impianto sono stati effettuati, e comprendente una miscela e/o combinazione di polimeri naturali e/o sintetici nella quale è presente fibroina.

M. DISEGNO





Classe Internazionale: **C12N 5/00**

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"SUBSTRATO BIOARTIFICIALE PER LA REALIZZAZIONE DI TESSUTI E ORGANI ANIMALI, IN PARTICOLARE UMANI"

a nome **CONSORZIO PER GLI STUDI UNIVERSITARI**

a **37129 VERONA**

dep. n. **VR99A 000082** del **1 OTT. 1999**

CAMPO DI APPLICAZIONE

10 La presente invenzione relativa al campo biomedicale, si riferisce in particolare ad un substrato per colture cellulari, atto a indurre la proliferazione di cellule di tessuti specializzati.

Tale substrato trova la sua applicazione ottimale nel campo medico-chirurgico, in quanto utilizzabile come substrato per la rigenerazione di organi e di tessuti da trapiantare su esseri umani.

15 La presente invenzione trova per esempio una sua applicazione particolarmente vantaggiosa nella produzione di una pelle artificiale rigenerante, da trapiantare su pazienti grandi ustionati o sofferenti di patologie che implicano la degenerazione dei tessuti cutanei.

STATO DELLA TECNICA

20 La pelle è l'organo più cospicuo del corpo umano, dal momento che corrisponde al 16% della sua massa, ed è quello con la maggiore superficie e che cresce e si rinnova alla velocità più elevata. Mediamente infatti un ciclo di ricambio completo delle cellule cutanee superficiali (epidermiche) si completa ogni tre-quattro settimane.

25 Contrariamente a quanto possa sembrare da una prima analisi superficiale delle sue



caratteristiche, la cute è anche uno degli organi più complicati di cui sia dotato il corpo umano, in quanto costituita da tipi cellulari estremamente specializzati, i quali assolvono in modo armonico a ruoli specifici molto diversi garantendo il mantenimento del rivestimento esterno del corpo, protezione dalle infezioni, dal caldo e dalla radiazione luminosa, il controllo termostatico della temperatura corporea ed il controllo inoltre delle perdite idriche (sudorazione), ed inoltre di grassi e vitamine.

Lo strato esterno della pelle umana che è privo di vascolarizzazione viene definito epidermide, ed è costituito principalmente da cellule strettamente aggregate tra di loro, chiamate cheratinociti. Tra le cellule presenti in quantità minori nell'epidermide si annoverano tra le altre i melanociti, le cellule di Merkel e le cellule di Langerhans. La cosiddetta "lamina basale" costituita da collagene di tipo IV e VII, fibronectina eccetera, segna il confine con il sottostante derma.

Dal punto di vista strutturale l'epidermide si presenta costituita da cinque strati cellulari che dall'esterno verso l'interno sono nell'ordine lo *stratum corneum*, lo *stratum lucidum*, lo *stratum granulosum*, lo *stratum spinosum* e lo *stratum basale* o *germinativum*, ed è grazie ad essi che può assolvere al suo ruolo di protezione meccanica del corpo umano. La storia naturale di qualunque cheratinocita dell'epidermide prevede che esso si differenzi progressivamente mentre si trasferisce dallo *stratum germinativum* allo *stratum corneum* entrando a far parte, in sequenza, di tutti gli strati interposti per trasformarsi infine in corneocita non vitale ed andare perduto per desquamazione a secco o durante le normali abluzioni. Lo *stratum germinativum* giace a diretto contatto con la lamina basale e nel suo ambito ha luogo la generazione di nuove cellule. Come già detto la lamina basale rappresenta il confine tra l'epidermide e il contiguo strato di connettivo detto derma, o corium.

Quest'ultimo è estremamente vascolarizzato ed è inoltre provvisto di recettori



connessi con fibre nervose che rendono possibile a livello cutaneo la ricezione sensoriale degli stimoli meccanici, fisici e chimici. Tra i meccanoriceptori si citano i corpuscoli di Pacini ed i corpuscoli di Meissner, questi ultimi in particolare responsabili della sensibilità tattile. I vasi sanguigni ed i nervi abbondano particolarmente nello strato più esterno del derma ed è prossimo o a contatto con la lamina basale.

Cellule caratterizzanti il derma sono inoltre i fibroblasti che vi si trovano dispersi in una matrice costituita da varie proteine fibrose, quali il collagene e l'elastina e da componenti della sostanza fondamentale amorfa, come i glicosaminoglicani (GAG) e i proteoglicani.

I fibroblasti assolvono ad un ruolo di primaria importanza in quanto, oltre a produrre i precursori delle fibre collagene ed elastiche ed i componenti della matrice amorfa, secernono anche fattori di crescita e citochine capaci di influire sui cheratinociti e sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni.

L'elevato livello di complessità strutturale proprio della cute umana è indubbiamente il problema più imponente da risolvere quando si cerchi di produrre dei tessuti artificiali che ne riproducano le caratteristiche morfofunzionali. Tali tessuti, chiamati comunemente dagli addetti al settore "skin-grafts", sono di particolare utilità e sono studiati con grande impegno, in particolare per alleviare le sofferenze delle vittime di grandi ustioni, e per coloro i quali sono affetti da patologie con implicazioni dermatologiche significative. I gravi esiti cicatriziali e la devastazione psicologica derivante dall'improvviso sconvolgimento delle caratteristiche estetiche che derivano da una grande ustione o in minor grado da una patologia con implicazioni dermatologiche significative, nonché le altre conseguenze funzionali del danno di un organo di una tale importanza quale la pelle hanno dunque indotto ricercatori di tutto il mondo a lavorare per giungere a soluzioni alternative che possano favorire i processi di guarigione frenando nel



contempo lo sviluppo di esiti cicatrizzabili deturpanti e migliorando sensibilmente l'aspetto estetico e la condizione psicologica del paziente grazie all'impiego di skin-grafts nelle zone lesionate ed eliminando quasi totalmente i rischi di rigetto.

Questi ultimi diminuiscono sempre di più all'aumentare della somiglianza del sistema "pelle artificiale" a quella naturale e con l'impiego ove possibile, di cellule del paziente o, alternativamente, di cellule umane di altra origine. Prima di arrivare alla produzione di tessuti cutanei artificiali si è dovuto svolgere un intenso lavoro di modellizzazione della pelle naturale, atto a ricostruire i sinergismi in atto durante il normale funzionamento dell'organo e in condizioni estreme, come subito dopo il verificarsi di una grave lesione e durante la guarigione da questa.

La ricostruzione dei tessuti cutanei della pelle non è un processo singolo, bensì il concorso di una serie di processi dinamici interattivi che coinvolgono le cellule epidermiche, dermiche, e del tessuto sottocutaneo e dei vasi sanguigni. Tali cellule comunicano attivamente tra di loro mediante il rilascio di messaggeri solubili - citochine - che interagiscono con specifici recettori di membrana.

La categorizzazione più generale di un processo ricostitutivo tissutale quale quello della pelle è compiuta individuando tre periodi distinti (Principles of Tissue Engineering, Lanza, R. P., Langer, R., Chick, W. L. 1997, Academic Press, R.G. Landes Company, Austin, Texas, U.S.A.) di reazione del tessuto stesso all'evento lesivo: (1) infiammazione, (2) formazione tissutale e (3) rimodellamento tissutale.

Il tessuto leso è costellato di vasi sanguigni recisi dai quali essuda sangue. Esso è inoltre discontinuo in modo proporzionale alla gravità dell'evento lesivo che ha subito. La primissima reazione riscontrabile è la formazione di un coagulo sanguigno. La fibrina della quale i coaguli sono ricchi blocca le perdite ematiche, uniforma la superficie del tessuto ferito e la rende meno attraversabile da parte di agenti ambientali nocivi. Le



5 piastrine dei coaguli inoltre assolvono al ruolo di produttori di mediatori tra i quali alcuni importanti fattori di crescita. La fibrina funge anche da agente di aggregazione di una ulteriore quantità di piastrine. Inoltre, nella sede della ferita pervengono numerosi macrofagi e leucociti neutrofili la cui azione è importante in quanto consente la ripulitura dell'area ferita da corpi estranei e dannosi (ad esempio batteri) per i tessuti danneggiati. I neutrofili muoiono spontaneamente o per effetto di fattori tossici e vengono a loro volta fagocitati dai macrofagi del tessuto.

10 In tale primo scenario come sopra delineato vanno inoltre inseriti enzimi ed agenti ossidanti che hanno la funzione di velocizzare e di innescare le varie reazioni scaturite dall'interazione tra le varie parti in gioco, nonchè di fungere da tampone laddove vi siano aree di maggiore vulnerabilità del tessuto, ovvero ove i batteri estranei mettano a repentaglio il processo protettivo delle superfici vive messo in atto dalle piastrine e dai neutrofili.

15 Vi è in concomitanza con l'infiltrazione di neutrofili l'accumulo di monociti macrofagi, attratti dal rilascio locale di particolari chemochine. Questi, tramite l'azione mediatrice di recettori integrinici, espressa ad hoc dalle cellule endoteliali dei vasi sanguigni, sono catturate localmente mentre attraversano con il sangue i vasi locali e penetrano nello stroma tissutale per fagocitare i residui cellulari e delle fibre collagene ed elastiche, gli elementi della matrice extracellulare, ovvero gli organismi patogeni ed i
20 neutrofili degenerati.

Inoltre, nell'ambito del tessuto, i monociti subiscono la metamorfosi in macrofagi infiammatori, in effetti elementi precursori del tessuto da rigenerare.

A poche ore dall'infortunio inizia la riepitelizzazione della ferita. Le cellule epiteliali che sono sopravvissute indenni all'evento lesivo migrano dalla loro sede iniziale
25 nelle aree precedentemente coperte dalle piastrine e quindi dai coaguli sanguigni e le



5 rivestono dando luogo ad un nuovo tessuto vivo e sul quale un'ulteriore crescita è possibile. Mentre i tamponi fisici rivelano a questo punto la loro temporaneità, le cellule epidermiche subiscono contestualmente un'evoluzione strutturale che portando al riassorbimento dei filamenti intermedi ed alla dissoluzione dei desmosomi, ne consente la
 5 mobilizzazione laterale. Le cellule epidermiche circostanti alla ferita sviluppano, in concomitanza, un apparato motorio che consente tale mobilità. Nelle zone non coperte, la superficie ferita è formata da una matrice provvisoria di fibrina, fibronectina, tenascina, vitronectina e collagene del tipo I.

10 Con il procedere della riepitelializzazione, le proteine della lamina basale riappaiono secondo una sequenza ben definita, a partire dai margini della ferita verso l'interno.

Quattro giorni dopo l'evento lesivo inizia a formarsi il tessuto di granulazione. La formazione di tale tessuto segna l'inizio dell'esistenza del tegumento come tessuto formato da cellule interdipendenti, in quanto diviene ricco di vasi capillari, macrofagi e fibroblasti i
 15 quali cooperano attivamente tra di loro. I macrofagi infatti fungono da fonte di citochine le quali giocano un ruolo di importanza fondamentale nell'angiogenesi e nella neoproduzione di fibre collagene ed elastiche da parte dei fibroblasti che pure rigenerano la nuova matrice extracellulare destinata a regolare il metabolismo cellulare. Tali
 20 citochine ad elevato potere proliferativo vengono comunemente considerate alla stregua di fattori di crescita. La matrice extracellulare provvisoria che dal processo trae origine è ricca di quelle sostanze che favoriscono ulteriormente lo sviluppo dei tessuti. Si citano a titolo di esempio la fibronectina ed il collagene, nonché l'acido ialuronico, grazie al quale le cellule mantengono la loro mobilità.

A tale punto del processo rigenerativo, i fibroblasti proliferano intensamente sotto
 25 lo stimolo mitogenico delle citochine e migrano verso l'area lesa, dapprima aderendo e poi



penetrando nei coaguli sanguigni attraverso la matrice fibronectinica.

5 Tra i fibroblasti e la matrice extracellulare si instaura a questo punto un equilibrio reciproco attraverso una sintesi continua, in quanto da una parte i fibroblasti arricchiscono la matrice dei suoi componenti fondamentali, mentre dall'altra la matrice regola la funzionalità cellulare grazie alle cellule-matrice.

Meccanismi di natura chemotattica regolano la traslazione dei fibroblasti i quali producono dei lamellipodi diretti verso la sorgente dello stimolo, creando nuove superfici cellulari e innescando un complicato meccanismo che ha come risultato la vera e propria mobilità della cellula.

10 La proliferazione dei fibroblasti cessa quando il sistema si è sufficientemente arricchito di matrice collagenica (la quale sarebbe essa stessa responsabile del blocco proliferativo di tali cellule, contrariamente all'effetto della matrice fibrinica e fibronectinica, la quale favorisce la proliferazione di fibroblasti).

15 La rigenerazione del tessuto è accompagnata da un concomitante processo di neo-vascularizzazione caratterizzato dalla sempre crescente ramificazione dei vasi capillari proliferanti e dalla neoformazione di aure capillari.

L'angiogenesi è resa possibile dal rilascio locale di citochine specifiche (tra cui il VEGF) che stimolano la proliferazione delle cellule endoteliali dei capillari. L'angiogenesi permette che il tessuto venga permeato dall'ossigeno e dalle sostanze nutritive indispensabili ai fini della sopravvivenza e del buon funzionamento del tessuto neoformato. Solo di recente si è arrivati ad identificare tracciare il parco di molecole che svolgono un ruolo fondamentale nell'angiogenesi. Tra queste si ricordano in particolare il fattore di crescita endoteliale vascolare (vascular endothelial growth factor - VEGF), l'angiogenina, l'angiotropina, l'interleuchina-8, la trombospondina, le ammine biogeniche e
25 l'acido lattico.



Un'ulteriore fase in cui la riorganizzazione concertata dei tessuti è più spinta e l'interazione tra i vari tipi di cellule in gioco è fortemente concertata, prevede la contrazione del tessuto di granulazione della ferita, e la riorganizzazione della matrice, durante la quale i fibroblasti della ferita assumono un ruolo e delle caratteristiche proprie delle cellule del muscolo liscio, chiamandosi così miofibroblasti e conferendo al tessuto di granulazione la capacità di contrarsi.

Ciò avviene contemporaneamente alla compattazione del tessuto connettivo, la quale è determinata dall'unione delle masse di collagene che formano una rete che può così, grazie alle interazioni con la matrice già presente, assecondare gli stimoli contrattili impressi dai miofibroblasti.

Il rimodellamento ed il catabolismo del collagene costituiscono il fenomeno trainante alla base della formazione della cicatrice. Tale processo si verifica comunque ad una velocità ridotta in quanto anche dopo le prime tre settimane dall'evento lesivo, quando l'accumulo di collagene fibrillare avviene alla massima velocità, la ferita cicatrizzata ha acquistato il trenta per cento soltanto della resistenza propria della pelle intatta. Al raggiungimento della suo massimo livello di guarigione, una superficie di pelle cicatrizzata raggiunge una resistenza pari al 70% a confronto con la pelle integra.

Avendo come sfondo uno scenario quale quello enunciato sopra, che non dettaglia in maniera sufficiente tutti i microfenomeni in gioco, la produzione con metodi sintetici di cute artificiale umana si è posta come una sfida difficilissima, al cui superamento spinge la necessità di ottenere una guarigione limitando al massimo gli esiti cicatriziali deturpanti.

E' noto da relativamente parecchio tempo l'impiego di pelle di origine cadaverica, la quale è risultata però avere capacità antigeniche, e perciò con un elevato rischio di rigetto da parte del soggetto trapiantato, per non menzionare il non trascurabile rischio di infezioni anche letali (ad esempio epatite C, AIDS, eccetera).





I "sostituti dermoepidermici", più comunemente noti come "pelle artificiale", sono il frutto dell'ottimizzazione meticolosa di procedure di coltivazione cellulare su supporti o substrati polimerici sovente impiegati nel caso di applicazioni successive sulle sedi di lesione. Gli spazi lasciati liberi dalle maglie del tessuto sono sufficienti a favorire, a proliferazione avviata, il popolamento della superficie polimerica alla massima velocità possibile.

Sono noti sul mercato dei sostituti dermici denominati Dermagraft®, Allograft® e Alloderm®.

L'Alloderm® è un sostituto dermico costituito da derma di donatore umano privato delle cellule proprie e dello strato epidermico, conservato a bassa temperatura e destinato ad essere usato in combinazione con un sottile strato di cellule epidermiche dell'ospite. La procedura di preparazione prevede anche l'inattivazione del virus nel tessuto prelevato dal donatore (in genere un cadavere).

La struttura proteica del derma, ancorché acellulare, sarebbe preservata dal processo di preparazione. Il materiale viene reidratato con soluzione fisiologica prima dell'impianto nella sede delle ustioni. L'esperienza clinica è limitata. La possibilità di infezioni, vista l'origine umana del prodotto, non può essere del tutto esclusa. Il processo di produzione è alquanto complesso ed il livello di qualità ha un'importanza assai critica.

Il Dermagraft® e l'Allograft® incorrono nella stessa tipologia di inconvenienti citati per quanto riguarda Alloderm®.

Un altro sostituto dermico è denominato Integra®. Il suo strato, dello spessore di 2 mm, è una combinazione di fibre collagene di origine bovina col GAG condroitin-6-solfato con pori del diametro di 70-200 µm e biodegradabile. Il suo strato esterno è costituito da un polimero che consente gli scambi di vapore acqueo.

L'Integra® sarebbe destinato all'applicazione su ustioni profonde, e la membrana esterna di



silicone dovrebbe essere sostituita dopo 2-3 settimane, da un autotrapianto di cellule epidermiche.

L'esperienza clinica è al momento alquanto limitata: sono stati riportati dei processi suppurativi subito al di sotto della membrana di silicone, mentre il processo di
5 fabbricazione è estremamente complesso e costoso.

Inoltre, l'uso di materiale di origine bovina espone al rischio di encefalopatia spongiforme, patologia altresì nota con il nome inglese di "mad cow disease" o "morbo della mucca pazza".

Il documento US-A-5,266,480 descrive una coltura tridimensionale di fibroblasti su
10 di un substrato polimerico (matrice stromale) costituito da una fra le seguenti: nylon (poliammidi), dacron (poliesteri), polistirene, polipropilene, poliacrilati, composti polivinilici quali per esempio polivinilcloruro, policarbonati, il teflon, il termanox, la nitrocellulosa, il catgut, il cotone, la cellulosa, la gelatina, ed il destrano. Sono tutti, materiali, ad eccezione della fibra di cotone, del catgut, della cellulosa, della gelatina e del
15 destrano, polimerici di origine sintetica, lavorati in modo da dare origine a una fibra. Si propone inoltre il pretrattamento della matrice prima delle inoculazioni, e l'arricchimento delle coltivazioni cellulari con proteine di vario genere quali collagene, glicoproteine, glicosamminoglicani ed altri materiali simili al fine di velocizzare il processo proliferativo.

20 In tale brevetto si evidenzia l'importanza di trovare un substrato che funga da supporto in modo tale da lasciare degli spazi sufficienti ad evitare che cellule vi rimangano intrappolate e cessino la produzione dei fattori di crescita necessari al sostentamento del processo proliferativo.

Tali fattori di crescita non devono essere aggiunti alla matrice in quanto sono le cellule
25 stesse a produrli continuamente, creando già dall'inizio quegli equilibri che sono propri del



tessuto cutaneo con un elevato grado di evoluzione.

Le prime cellule stromali vengono espianate da organi e separate seguendo metodi tradizionali.

5 E' un grave inconveniente posto da tale invenzione quello di proporre dei substrati comunque sintetici e non riassorbibili, costituenti a pieno titolo dei corpi estranei sin dal momento del trapianto, con i conseguenti rischi di reazione di rigetto a questi associati.

10 E' un ulteriore inconveniente di tale procedimento quello di essere molto complicato e di richiedere il ricorso a più fasi di inoculazione per ottenere un tessuto cutaneo totalmente formato e costituito dalla necessaria quantità di cellule differenziate che assolvano ai diversi ruoli che a loro competono nel tessuto sano e pienamente sviluppato.

E' inoltre necessario in questo caso, in particolare per la pelle, ricorrere a cellule espianate dalla pelle del prepuzio di neonati, ottenuta tramite operazioni chirurgiche di circoncisione.

15 Nel documento US-A-5,902,741 vengono descritte delle colture tridimensionali di cellule cartilaginee coltivate su d'una matrice biocompatibile di materiale non vivente effettuate al mezzo di coltura di TGF- β .

20 Tra le cellule stromali coltivate come previsto in tale brevetto si annoverano, oltre ai condrociti, i progenitori dei condrociti, i fibroblasti, le cellule endoteliali, i macrofagi, i monociti, gli adipociti, le cellule stromali del midollo osseo, ed altre.

Tali cellule sono fatte proliferare facendole aderire ad una struttura rigida costituita da un polimero biocompatibile fino alla sua completa ricopertura. Tale struttura rigida è previsto che presenti degli spazi atti ad essere colmati dalle cellule stromali stesse. Secondo tale brevetto, una volta che le cellule stromali abbiano completato la formazione di un solido
25 tessuto di ricopertura della detta struttura polimerica biocompatibile rigida, cominciano a



seccernere fattori di crescita, fattori regolatori e sono pertanto pronte a fungere da supporto per l'impianto di cellule precedentemente coltivate in vitro, le quali troveranno le condizioni a loro ideali per proliferare e differenziarsi a seconda delle specifiche esigenze delle regioni tissutali nelle quali si trovano ad essere ubicate

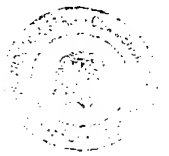
5 E' un inconveniente di tale trovato quello di necessitare ai fini della sua buona riuscita del ricorso a materiali sintetici che dopo l'impianto risultano non degradarsi, sciogliersi o scomparire in alcun modo o maniera.

E' un ulteriore inconveniente del trovato citato sopra quello che il procedimento per ottenere la proliferazione e la differenziazione di cellule tissutali specializzate, tesa pure
10 alla ricostituzione di un organo o di una o più parti di questo, sia proceduralmente oltremodo complessa in quanto, prima dell'impianto delle cellule desiderate, si deve sempre e comunque ricoprire la struttura di materiale sintetico con le cellule stromali, la qual cosa rappresenta una fase di transizione che non conduce direttamente al risultato desiderato e che necessita di tempi non trascurabili, andando così a compromettere la
15 pronta disponibilità del prodotto, talvolta cruciale in situazioni di emergenza.

Il brevetto US-A-4,703,108 descrive un procedimento per la preparazione di matrici biodegradabili in forma di spugne tridimensionali o di fogli bidimensionali, per il quale viene utilizzato un materiale a base di collagene, scelto tra quelli del tipo I e II, i quali vengono liofilizzati e fatti reagire con un agente di reticolazione come la
20 carbodiimide o un estere attivo succinimidico. Dopo tale reazione di reticolazione, la massa così ottenuta viene sottoposta a delle condizioni estreme di disidratazione dopo le quali si ottiene il materiale spugnoso o foliaceo desiderato. Tale materiale conterrà inoltre un vettore chimico scelto fra un gruppo comprendente, fra gli altri, il collagene dei tipi IV e V, la fibronectina e la laminina.

25 E' un evidente svantaggio del procedimento appena sopra brevemente descritto





quello di essere alquanto complesso e sostanzialmente lungo.

Esso inoltre comprende due fasi di essiccamento, una delle quali, la seconda, in condizioni estreme, che vanno condotte con grandissima cautela, in quanto con esse si può giungere a provocare dei danni irreparabili al materiale, che conseguentemente
5 risulterebbe essere non utilizzabile e costringerebbe gli operatori a ricominciare la procedura dall'inizio, con evidenti perdite di tempo.

Da tale ultimo inconveniente derivano pure delle difficoltà a concepire il procedimento tutelato nella privativa citata sopra ad un livello industriale o comunque teso alla produzione di quantità di materiale finito che superino quelle sperimentali di
10 laboratorio.

E' un ulteriore inconveniente di tale procedura che per l'ottenimento del risultato desiderato si debba ricorrere ad un parco di sostanze molto ampio, alcune delle quali sono dei composti chimici la cui utilizzazione richiede una particolare cautela.

Un altro inconveniente del procedimento descritto nella specifica di brevetto
15 sopracitata è che in essa si cita il ricorso al collagene come solo materiale da utilizzare, il quale ha dei limiti in quanto possiede delle proprietà e caratteristiche fisse, pertanto è poco adattabile a differenti situazioni.

E' ancora un ulteriore inconveniente di tale procedimento quello di necessitare del collagene il quale è di origine bovina e può essere veicolo di contagio dell'encefalopatia
20 spongiforme, ed è comunque allergenico. Inoltre viene metabolizzato, quindi bioriassorbito, per via enzimatica, pertanto non offre né la garanzia che tale riassorbimento avvenga fino alla sua totale scomparsa, nè quella che il tessuto trapiantato e rigenerato sia riportato alla sua piena funzionalità originale.

Anche nel brevetto US-A-5,670,483 si descrive una serie di membrane
25 macroscopiche stabili che si formano per autoassemblaggio dovuto all'alternanza

riscontrabile in esse di peptidi anfili idrofili ed idrofobici. Tali membrane hanno un vasto campo di applicabilità, nel quale è compreso il loro uso come pelle artificiale.

Un inconveniente che tali macromembrane presentano è quello di non essere biodegradabili e biorassorbibili. Pertanto, esse mantengono inalterate le loro
5 caratteristiche meccaniche una volta impiantate, caratteristiche che non corrispondono esattamente con quelle della pelle umana. Perciò, le membrane in questione non raggiungono mai integrazione completa nell'ambiente tissutale nel quale il loro impianto o trapianto vengono compiuti.

Il documento US-A-4,963,489 descrive un sistema di coltura di cellule e tessuti a
10 sviluppo tridimensionale.

Il procedimento descritto prevede una fase nella quale cellule derivate da un tessuto specifico vengono espantate, inoculate e coltivate su una matrice stromale a sviluppo tridimensionale. Le cellule stromali avranno avuto in una fase immediatamente precedente una crescita sino a confluenza su una struttura sintetica, fino a copertura della stessa e
15 pertanto saranno adatte a tal punto a fungere a pieno da supporto per la crescita delle cellule impiantate. Si prevede che lo stroma comprenda fibroblasti di origine fetale o provenienti da individui adulti; alternativamente sarà stato espantato da cadavere.

Di nuovo, il supporto stromale viene coltivato su di una matrice sintetica tridimensionale la quale non è di per sé biorassorbibile. Tra le varie opzioni è previsto
20 pure il ricorso al cotone ed alla cellulosa, anch'esse fibre naturali, però estremamente resistenti agli attacchi chimici che può sferrare un sistema naturale quale quello rappresentato dal corpo umano. E' previsto anche l'uso della gelatina, la quale non è altro che collagene denaturato, pertanto ne presenta gli stessi limiti e difetti, enunciati nella descrizione del brevetto US-A-4703108.

25 E' un primo inconveniente del trovato descritto appena sopra quello di prevedere la



permanenza del materiale sintetico utilizzato come matrice, anche una volta che la coltura delle cellule specializzate sia stata ultimata.

Questo fatto può avere di per sé delle conseguenze spiacevoli per il trapiantato, soprattutto a lungo termine. Ove si avesse per esempio la ricostruzione di una porzione funzionante di un organo attivo del corpo umano, parte del volume di questo verrebbe ad essere occupato dal materiale sintetico, il che ne ridurrebbe le capacità funzionali.

E' un ulteriore inconveniente del trovato citato appena sopra il fatto di necessitare di procedure di preparazione complesse. Si pensi ad esempio solo al fatto che per rendere maggiormente biocompatibile il materiale sintetico utilizzato come matrice, esso deve essere ricoperto di uno strato di materiale adatto, quale per esempio il collagene che è normalmente di origine bovina, la qual cosa richiede tempo e complica oltremodo il lavoro da compiersi in fase di pre-trapianto.

Già da alcuni anni, il mondo scientifico e tecnologico, ha iniziato a studiare usi alternativi della seta e nello specifico della fibroina, sfruttando le peculiari proprietà della proteina rigenerata.

E' stata valutata la permeabilità all'ossigeno, permeabilità ionica, resistenza a enzimi proteolitici, a soluzioni acide e alcaline, la trasparenza e le proprietà meccaniche.

Sono state ipotizzate applicazioni nel campo biomedico nel settore delle lenti a contatto, bendaggi per ustioni, cornea artificiale, biosensori. Diversi test di biocompatibilità sono stati già effettuati, anche se frammentari: test di emocompatibilità (H. Sakabe et. Al.: In vivo blood compatibility of regenerated silk fibroin. SEN-I GAKKAISHI, vol.45,n.11, 1989, 487-490); colture cellulari (Y. Gotoh et. Al.: Synthesis of poly(ethylene glycol)-silk fibroin conjugates and surface interaction between L-929 cells and the conjugates. Biomaterials, vol.18, n.3, 1997, 267-271).

La riassorbibilità della fibroina è ben nota per esempio dal documento US-A-



5.606,019 nel quale si descrive l'uso di un copolimero di elastina e di fibroina da utilizzarsi come materiale biorassorbibile, la cui velocità di bioassorbimento varia al variare della percentuale dei due polimeri proteici nella miscela. Nella specifica vengono esaltate le caratteristiche di resistenza della miscela e la sua contestuale facilità a essere riassorbita nelle condizioni ambientali imposte dalla specifica regione del corpo umano per la quale il materiale viene prodotto ed utilizzato.

La gamma di applicazioni è ampia e comprende fibre, oggetti stampati, membrane atte ad evitare le aderenze, bende per ferite, filo e graffe per suture.

Un primo inconveniente di tale trovato è che consiste di un procedimento per la produzione delle proteine da utilizzarsi per l'ottenimento del materiale biorassorbibile, basato su tecniche di ingegneria genetica, pertanto complesse, che comprendono la manipolazione di plasmidi, il loro trasferimento e la loro amplificazione in cellule di *Escherichia coli*, e fasi di raffinazione e separazione del prodotto finito (work-up) da condurre con estrema cura. Si può notare che, nel documento US-A-5,606,019, non si suggerisce l'uso di fibroina come substrato per la coltura, la proliferazione e la differenziazione di cellule di alcun tipo.

Nel documento WO-A-98/57676 si riconoscono le proprietà di biocompatibilità, flessibilità, resistenza alle infezioni, della fibroina e della sericina e si descrive pertanto il loro utilizzo per la produzione di materiale per la copertura di ferite.

La fibroina viene utilizzata in forma non cristallina, con un grado di cristallizzazione che rimane al di sotto del 10%, o in forma di polvere.

Nel brevetto US-A-5,932,207 si descrive invece un sistema da trapiantare, adatto alla produzione di parti biologiche, in particolare organi di organismi viventi, il quale sostanzialmente consiste di un componente strutturale, un componente atto a favorire la copertura del componente strutturale con cellule specializzate, un componente di adesione





grazie al quale si assicura una sufficiente aderenza delle stesse alla struttura, ed un componente di maturazione tramite il quale le cellule specializzate che sono diventate parte del nuovo sistema, maturano ed eventualmente differenziano.

5 Ancora una volta, data la natura dei materiali formanti il componente di adesione, risulta necessario il ricorso a processi di degradazione e di riassorbimento di lunga durata e di non sicura riuscita.

Inoltre, il procedimento necessario per l'ottenimento del materiale da trapiantare ed il materiale in quanto tale sono complicati; non risulta intuitiva infatti la produzione del presidio descritto in quantità superiori a quelle di laboratorio.

10 Nel documento WO-A-96/25961 si descrive invece l'uso delle fibre di collagene per la produzione di una matrice extracellulare bioriassorbibile, e nel documento EP-A-0913162 si descrive un uso specifico del collagene in forma di tessuto, adatto alla riparazione di difetti tissutali.

FONTI BIBLIOGRAFICHE

15 Akai, H. Ultrastructure of fibroin in the silk gland of larval *Bombyx mori*. Exp.Cell Res., 69: 219-223, 1971.

20 Armato, U., Nussdorfer, G. G., Neri, G., Draghi, E., Andreis, P. G., Mazzocchi, G., and Mantero, F. Effects of ACTH and 3',5'-cyclic purine nucleotides on the morphology and metabolism of normal adult human adrenocortical cells in primary tissue culture. Cell Tissue Res., 190 : 187-205, 1978.

25 Auger, F. A., Lopez Valle, C. A., Guignard, R., Tremblay, N., Noel, B., Goulet, F., and Germain, L. Skin equivalent produced with human collagen. In Vitro Cell Dev.Biol.Anim., 31: 432-439, 1995.



Berthod, F. and Damour, O. In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns. *Br.J.Dermatol.*, 136: 809-816, 1997.

- 5 Burke, J. F., Yannas, I. V., Quinby, W. C. J., Bondoc, C. C., and Jung, W. K. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann.Surg.*, 194: 413-428, 1981.

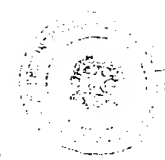
- 10 Canetti, M., Seves, A., Secundo, F., and Vecchio, G. CD and small-angle x-ray scattering of silk fibroin in solution. *Biopolymers*, 28: 1613-1624, 1989.

Chevallier, A. and Garel, J. P. Studies on tRNA adaptation, tRNA turnover, precursor tRNA and tRNA gene distribution in *Bombyx mori* by using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochimie*, 61: 245-262, 1979.

- 15 Clayton, M. C. and Bishop, J. F. Perioperative and postoperative dressing techniques for Integra Artificial Skin: views from two medical centers. *J.Burn.Care Rehabil.*, 19: 358-363, 1998.

- 20 Coulomb, B., Friteau, L., Baruch, J., Guilbaud, J., Chretien-Marquet, B., Glicenstein, J., Lebreton-Decoster, C., Bell, E., and Dubertret, L. Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast.Reconstr.Surg.*, 101: 1891-1903, 1998.

- 25 Dal Pra, I., Tognana, E., Guerriero, C., and Armato, U. Investigations into



mechanisms modulating proliferation, differentiation, and apoptosis in cultured liver, adrenal, skin, and bone cells. *Ital.J.Anat.Embryol.*, 102: 9-119, 1997.

5 Eaglstein, W. H. and Falanga, V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Clin.Ther.*, 19: 894-905, 1997.

Eaglstein, W. H. and Falanga, V. Tissue engineering and the development of Apligraf, a human skin equivalent. *Cutis.*, 62: 1-8, 1998.

10 Eaglstein, W. H. Dermagraft treatment of diabetic ulcers. *J.Dermatol.*, 25: 803-804, 1998.

15 Fossey, S. A., Nemethy, G., Gibson, K. D., and Scheraga, H. A. Conformational energy studies of beta-sheets of model silk fibroin peptides. I. Sheets of poly(Ala-Gly) chains. *Biopolymers*, 31: 1529-1541, 1991.

20 Fraser, R. D., MacRae, T. P., and Stewart, F. H. Poly-l-alanylglycyl-l-alanylglycyl-l-seryl-glycine: a model for the crystalline regions of silk fibroin. *J.Mol.Biol.*, 19: 580-582, 1966.

Iizuka, E. Species specificity of the conformation of silk fibroin in solution. *Biochim.Biophys.Acta*, 160: 454-463, 1968.

25 Jaksic, T. and Burke, J. F. The use of "artificial skin" for burns. *Annu.Rev.Med.*, 38:107-17: 107-117, 1987.



Lotz, B. and Colonna, C. F. The chemical structure and the crystalline structures of *Bombyx mori* silk fibroin. *Biochimie*, 61: 205-214, 1979.

5 Menegazzi, M., Guerriero, C., Carcereri, d. P., Cardinale, C., Suzuki, H., and Armato, U. TPA and cycloheximide modulate the activation of NF-kappa B and the induction and stability of nitric oxide synthase transcript in primary neonatal rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, 379: 279-285, 1996.

10 Minoura, N., Aiba, S., Gotoh, Y., Tsukada, M., and Imai, Y. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J.Biomed.Mater.Res.*, 29: 1215-1221, 1995.

15 Minoura, N., Aiba, S., Higuchi, M., Gotoh, Y., Tsukada, M., and Imai, Y. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 208: 511-516, 1995.

20 Minoura, N., Tsukada, M., and Nagura, M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials*, 11: 430-434, 1990.

Ohshima, Y. and Suzuki, Y. Cloning of the silk fibroin gene and its flanking sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 74: 5363-5367, 1977.

25 Pandit, M. W., Sagar, A. J., and Rao, M. S. Studies on silk fibroin. I. Molecular weight, sedimentation coefficient, viscosity and optical rotation of silk fibroin from





carbonate-extracted silk fiber. Arch.Biochem.Biophys., 149: 259-268, 1972.

Purdue, G. F., Hunt, J. L., Still, J. M. J., Law, E. J., Herndon, D. N., Goldfarb, I. W., Schiller, W. R., Hansbrough, J. F., Hickerson, W. L., Himel, H. N., Kealey, G. P., Twomey, J., Missavage, A. E., Solem, L. D., Davis, M., Totoritis, M., and Gentzkow, G. D. A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. J.Burn.Care Rehabil., 18: 52-57, 1997.

10 Soejima, K., Nozaki, M., Sasaki, K., Takeuchi, M., and Negishi, N. Treatment of giant pigmented nevus using artificial dermis and a secondary skin graft from the scalp. Ann.Plast.Surg., 39: 489-494, 1997.

15 Sprague, K. U. The *Bombyx mori* silk proteins: characterization of large polypeptides. Biochemistry, 14: 925-931, 1975.

Whitfield, J. F., Isaacs, R. J., Jouishomme, H., MacLean, S., Chakravarthy, B. R., Morley, P., Barisoni, D., Regalia, E., and Armato, U. C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107- 111), stimulates membrane-associated protein kinase C activity and modulates the proliferation of human and murine skin keratinocytes. J.Cell Physiol, 166: 1-11, 1996.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

E' un primo scopo della presente invenzione quello di superare gli inconvenienti ed i limiti della tecnica nota proponendo l'uso di un materiale naturale tal quale o combinato con materiali biodegradabili e non, di origine sintetica o naturale, come substrato adatto



allo sviluppo, alla proliferazione ed alla corretta differenziazione di cellule tissutali specializzate del corpo umano, come ad esempio le cellule costituenti la pelle umana, materiale che sia biocompatibile e stabile o bioriassorbibile in tempi predeterminabili, in modo tale da permettere l'ottenimento di tessuti, strutture ed organi che possono essere
5 trapiantati e/o impiantati nel corpo umano con una parziale o completa integrazione nello stesso.

E' un secondo scopo della presente invenzione quello di proporre l'uso di un materiale come substrato adatto allo sviluppo almeno delle classi cellulari sopra citate che sia di facile, immediata e diretta produzione anche su larga scala.

10 Le caratteristiche salienti della presente invenzione si trovano dettagliate nella rivendicazione principale.

Le rivendicazioni dipendenti delineano forme di realizzazione particolarmente vantaggiose della presente invenzione.

I sopradetti scopi sono stati raggiunti grazie all'uso della fibroina naturale ottenuta
15 per esempio e non limitativamente dal baco da seta *Bombyx mori*, anche opportunamente funzionalizzata e/o miscelata e/o copolimerizzata e/o ricoprente sostanze di origine naturale e/o sintetica, come substrato biocompatibile e bioriassorbibile in tempi predeterminati adatto a promuovere la crescita, la proliferazione e la maturazione e differenziazione delle cellule formanti tessuti o organi specializzati del corpo umano, cioè
20 tessuti costituiti da cellule con un elevato livello di differenziazione, come per esempio e non limitativamente quelli costituenti la pelle.

Le cellule la cui proliferazione e differenziazione è promossa dal substrato ottenuto tramite l'uso della fibroina conformemente alla presente invenzione possono dare origine a strutture sia bidimensionali, che tridimensionali, a seconda della forma della matrice
25 substratica sulla quale queste vengano coltivate.

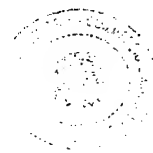


E' infatti noto dalla letteratura che le cellule che si desidera fare proliferare nelle tre dimensioni trovano, anche all'uopo opportunamente stimulate tramite l'aggiunta di fattori adatti, una condizione molto simile a quella naturale, sempre che si fornisca loro un substrato adatto.

5 Secondo un ulteriore aspetto particolarmente vantaggioso della presente invenzione, il substrato ottenuto conformemente alla presente invenzione, opportunamente funzionalizzato e/o miscelato e/o copolimerizzato, è particolarmente adatto a favorire la crescita, lo sviluppo, la maturazione e la differenziazione di osteoblasti normali di uomo
10 adulto derivanti tanto dalle ossa mascellari, quanto dalle altre ossa dello scheletro, di cellule mesoteliali normali del peritoneo di uomo adulto, di astrociti normali della corteccia del lobo temporale di uomo adulto, di tenociti (o fibroblasti dei tendini), di condrociti (o cellule isolate dal tessuto cartilagineo), di cellule endoteliali della tonaca intima dei vasi sanguigni, di cellule steroidosecernenti della corteccia surrenalica, di
15 cellule muscolari lisce della tonaca muscolare dell'intestino e dei vasi sanguigni, di epitelio squamoso del cavo orale o della congiuntiva/cornea, e di preadipociti umani del tessuto connettivo adiposo bianco.

Si sono compiuti studi sulle interazioni tra la biomembrana secondo la presente invenzione ed i fibroblasti dermici normali di uomo adulto.

20 Si è effettuata una serie di indagini ulteriori sulle interazioni della membrana oggetto della presente invenzione con il tipo cellulare principale che popola il connettivo dermico umano. Pertanto, sono stati isolati ceppi di fibroblasti normali ottenuti da campioni di derma di quattro individui diversi. Tali cellule sono state quindi seminate su campioni della biomembrana secondo la presente invenzione, contenuti in pozzetti quadrangolari di piastre da coltura *in vitro* e le biomembrane portanti le cellule sono state
25 incubate a 37° C per periodi di tre settimane.



Ad intervalli predefiniti si è provveduto al campionamento del medium colturale per valutare il consumo cellulare di glucosio e la produzione di acido lattico. Inoltre, al fine di ottenere informazioni più precise sugli eventi verificantisi in corrispondenza dell'interfaccia tra i fibroblasti umani e la biomembrana, oggetto della presente invenzione, campioni di questa che erano stati a contatto con le cellule per periodi predefiniti sono stati esaminati, una volta distaccati i fibroblasti senza danneggiare la membrana, al microscopio elettronico a scansione, strumento che in mani esperte pone in evidenza i dettagli più fini delle superfici dei materiali esaminati.

I risultati di questi studi dimostrano che i fibroblasti umani ottenuti da campioni di derma prelevati da quattro individui diversi e seminati sulla biomembrana oggetto della presente invenzione non solo, com'era da attendersi, si moltiplicano molto attivamente (dati non mostrati), ma nel contempo consumano anche quantità crescenti di glucosio, il carburante cellulare preferito, secernendo contemporaneamente nel medium di crescita quantità sempre maggiori di acido lattico, il metabolita della glicolisi anaerobia. Le curve *cumulative* tanto del glucosio consumato quanto del lattato prodotto e secreto hanno un andamento esponenziale abbastanza consimile che bene si accorda con la simultanea, rimarchevole espansione della popolazione di cellule connettivali sulla biomembrana oggetto della presente invenzione. Le stesse curve dimostrano che, pur nell'ambito di una variabilità biologica di ambito accettabile (i soggetti umani non sono "inbred"), i fibroblasti di quattro individui diversi si comportano, una volta seminati sulla biomembrana, in modo corrispondente. Pertanto, avendo testato nel corso di due semestri cellule derivanti da cinque individui diversi, è ragionevole assumere che il biomateriale secondo la presente invenzione possa stabilire interazioni biologiche molto buone con i fibroblasti della maggioranza dei soggetti umani. Esso pertanto sembra prestarsi molto bene come substrato di interventi di ricostruzione tissutale in ambito clinico.





Le indagini di microscopia elettronica a scansione effettuate sui nostri preparati hanno portato alla luce un insieme di dettagli molto interessanti sulla natura delle interazioni tra i fibroblasti dermici umani e la biomembrana oggetto della presente invenzione. Quando sia mancato il contatto con le cellule connettivali umane, la superficie della biomembrana appare punteggiata in modo del tutto casuale da rilievi e depressioni di dimensioni alquanto modeste (Figura 10). Dopo una settimana di contatto con i fibroblasti umani ed una volta che questi siano stati opportunamente rimossi, la superficie della biomembrana B appare nettamente diversa, essendo segnata da una serie di solchi, per lo più tra loro paralleli delimitanti delle fossette o nicchie, mostrati nella Figura 11 ed indicati da frecce. Evidentemente, nel corso dei primi giorni di coltura *in vitro*, le cellule si "scavano" delle "tane" nell'ambito della biomembrana, presumibilmente grazie alla secrezione nell'ambiente extracellulare di enzimi litici. Dopo due settimane di contatto con i fibroblasti ed una volta che quest'ultimi siano stati rimossi, le "nicchie" in questione non sono più visibili sulla superficie della biomembrana anche se l'osservazione viene effettuata ad un ingrandimento maggiore (Figura 12). La superficie della membrana non presenta più depressioni, ma al contrario dei rilievi di dimensioni maggiori o minori (Figura 12, frecce). È chiaro che le cellule hanno nel frattempo prodotto e secreto all'esterno i componenti della matrice extracellulare amorfa i quali hanno colmato le "nicchie" e si sono accumulati sulle superfici ad esse adiacenti. Perciò, dopo una prima fase di assestamento sulla biomembrana, i fibroblasti umani cominciano a sintetizzare i materiali necessari per ricostituire l'ambiente a loro familiare, cioè la matrice extracellulare amorfa del connettivo dermico. In un linguaggio un po' meno scientifico, le cellule umane si danno da fare per "mettersi a loro agio". Osservando la Figura 13 si nota che dopo tre settimane di contatto con i fibroblasti ed una volta che quest'ultimi siano stati opportunamente rimossi, la superficie della biomembrana ha assunto un aspetto vitreo, in



quanto un materiale omogeneo, "trasparente", ne copre le irregolarità.

Su tale superficie spiccano più o meno in rilievo alcuni fascetti di fibre con andamento lievemente ondulato che assumiamo essere dei fascetti di fibre collagene neofornate evidenziate sulla stessa figura 15 da frecce. Pertanto, una volta ricostituita
5 quantità adeguate di matrice extracellulare amorfa, i fibroblasti producono e riversano all'esterno, dove vengono assemblati, i precursori delle fibre collagene proprio come avviene di norma *in vivo*.

La neoproduzione delle fibre collagene indicherebbe che i fibroblasti umani posti a contatto con la biomembrana oggetto della presente invenzione non solo proliferano
10 attivamente ma raggiungono anche un livello piuttosto elevato di differenziazione e di maturazione funzionale.

Infine, indagini di immunoistochimica hanno rivelato che nei fibroblasti umani coltivati sulla biomembrana, come avviene anche *in vivo*, la proteina vimentina costituisce i filamenti intermedi del citoscheletro.

15 In breve, l'insieme delle osservazioni dimostra in modo convincente che la biomembrana secondo la presente invenzione costituisce un supporto capace di interagire in modo pressoché ottimale, sotto il profilo biologico, con i fibroblasti dermici di uomo consentendo loro non solo di proliferare attivamente ma anche di maturare funzionalmente.

20 Il risultato finale è che la biomembrana conforme alla presente invenzione viene ad essere abitata da una popolazione di fibroblasti umani normali maturi che produce e secerne all'esterno tanto i componenti della matrice extracellulare amorfa quanto i precursori delle fibre collagene (e forse anche elastiche), proprio come avviene nel tessuto connettivo normale *in vivo*.

25 In conclusione, la biomembrana secondo la presente invenzione si dimostra sotto il



profilo biologico un substrato atto a fungere da supporto per l'allestimento di un derma bioartificiale suscettibile di applicazioni cliniche.

Al fine di provarne sperimentalmente la validità, si sono compiuti studi sulle interazioni tra la biomembrana secondo la presente invenzione ed i cheratinociti (cellule epidermiche) umani normali.

I cheratinociti formano dunque come visto nei primi paragrafi lo strato più superficiale, detto solitamente *epidermide*, del tegumento. Sono cellule epiteliali per definizione in quanto, in modo estremamente diverso dai fibroblasti, si aggregano tra di loro in modo assai strettamente aderente, per cui lo spazio extracellulare tra due cellule epidermiche contigue è minimo. Inoltre, le cellule epidermiche producono ed emettono all'esterno numerose citochine tramite le quali comunicano intensamente con i cheratinociti adiacenti. *In vivo* solo i cheratinociti situati nello *stratum germinativum* dell'*epidermide*, cioè quello posto a stretto contatto con la lamina basale (che segna il confine con il tessuto connettivo), sono in grado di proliferare e di dividersi per mitosi. Negli altri strati dell'*epidermide* i cheratinociti vanno incontro a processi progressivi di differenziazione ed apoptosi ("*diffpoptosis*") a seguito dei quali si trasformano infine in elementi, le cosiddette scaglie cornee, non più vitali ma ancora capaci di svolgere un'attività di protezione meccanica e di prevenire una perdita eccessiva di acqua. I cheratinociti umani possono essere coltivati *in vitro*, ma necessitano di un apporto continuo di fattori di crescita esogeni che *in vivo* sono in parte prodotti dai fibroblasti del derma sottostante ed in parte ricavati dal sangue circolante nei capillari dermici. La riproduzione di almeno una parte consistente delle interazioni che hanno luogo *in vivo* tra i cheratinociti ed i fibroblasti dermici costituirebbe il vantaggio principale dei sostituti dermoepidermici (lambi di cute bioartificiale) rispetto alle lamine formate da cheratinociti soltanto.



I cheratinociti ottenuti mediante dissociazione enzimatica dall'epidermide di tre soggetti diversi sono stati seminati su porzioni della biomembrana secondo la presente invenzione (1) da soli, (2) in presenza sulla stessa superficie di fibroblasti umani preventivamente irradiati (e cioè incapaci di attività proliferativa ma vitali almeno per un certo tempo), e (3) in presenza sulla superficie opposta della biomembrana di fibroblasti umani precedentemente irradiati o meno.

Va tenuto presente che la cocoltura con i fibroblasti aveva lo scopo di ricostituire una situazione simile a quella *in vivo*, in cui i due tipi di cellule sono sottoposti ad interazioni reciproche. La coltura *in vitro* delle membrane oggetto della presente invenzione recanti cheratinociti con o senza fibroblasti è stata protratta per almeno tre settimane.

I risultati ottenuti dimostrano per la prima volta in assoluto che i cheratinociti umani normali seminati su campioni della biomembrana in assenza di fibroblasti vi aderiscono prontamente formando degli aggregati cellulari di dimensioni piuttosto piccole. A tre giorni dalla semina, i cheratinociti hanno l'aspetto epiteliale che è tipico per loro e possiedono dei caratteri citologici normali. Tuttavia, l'assenza dei fibroblasti si fa sentire in quanto i cheratinociti crescono lentamente e a nove giorni dalla semina gli isolotti cellulari sono ben lontani dalla confluenza (Figura 16). Queste osservazioni dimostrano che la biomembrana consente l'adesione, la sopravvivenza ed una crescita alquanto lenta dei cheratinociti umani normali: un risultato iniziale alquanto incoraggiante.

Anche dopo essere stati seminati su d'una delle superfici della biomembrana in precedenza coperta in parte da fibroblasti umani irradiati (non proliferanti ma vitali), i cheratinociti umani hanno aderito prontamente al substrato. Tre giorni dopo la semina i cheratinociti sono alquanto numerosi e formano degli isolotti piuttosto estesi tra i quali si distinguono le forme affusolate dei fibroblasti; anche in questa situazione i caratteri

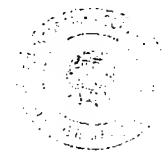




citologici dei cheratinociti appaiono normali (Figg. 17 e 18). Dopo nove giorni di coltura la differenza notata inizialmente con le membrane seminate con cheratinociti soltanto è ancora più evidente: gli isolotti di cheratinociti hanno dimensioni assai più ampie, mentre la maggior parte dei fibroblasti irradiati (incapaci di replicarsi) è scomparsa (Fig. 19).

5 Dopo 15 giorni dalla semina, i fibroblasti irradiati sono completamente scomparsi mentre gli isolotti di cheratinociti sono confluiti in un tappeto continuo di cellule quasi tutte ancora di dimensioni alquanto piccole e, pertanto, attivamente proliferanti (Fig. 20). D'altro canto, i cheratinociti umani cocoltivati con fibroblasti preirradiati su una *superficie di plastica* formano, dopo nove giorni, degli isolotti di dimensioni discrete ma nettamente inferiori in media a quelle degli isolotti coetanei sulla biomembrana oggetto della presente invenzione e parte delle cellule epidermiche ha nel frattempo assunto dimensioni cospicue ha cioè abbandonato l'attività proliferativa per andare irreversibilmente incontro alla "diffpoptosis". Pertanto, sulla biomembrana la compresenza dei fibroblasti umani irradiati stimola in modo significativo l'attività proliferativa dei cheratinociti e l'interazione con la biomembrana previene i fenomeni di *diffpoptosis*. Grazie a ciò, i cheratinociti umani si moltiplicano rapidamente ricostituendo in 15 giorni una struttura continua simile allo strato germinativo dell'epidermide.

Infine, anche quando sono stati seminati sulla superficie opposta a quella su cui erano stati fatti aderire dei fibroblasti umani preventivamente irradiati o meno, i cheratinociti umani hanno formato già dopo tre giorni numerosi isolotti ben distinti, formati da cellule con caratteri citologici normali, che nel corso di nove giorni si sono espansi in modo cospicuo e che in 15 giorni hanno formato un tappeto continuo di cellule tutte di piccole dimensioni e, perciò, attivamente proliferanti. Se ne deduce che la presenza di fibroblasti anche sulla superficie opposta a quella occupata dai cheratinociti, e quindi in assenza di contatti intercellulari diretti, costituisce uno stimolo mitogenico potente per le



cellule epidermiche.

Nel loro insieme questi risultati dimostrano con chiarezza che la compresenza sui due lati opposti della biomembrana dei due tipi principali di cellule del tegumento, cioè i cheratinociti ed i fibroblasti, non solo è tecnicamente possibile, ma determina anche lo stabilirsi di interazioni reciproche di segno positivo le quali, prevenendo i processi di *diffpoptosis*, inducono i cheratinociti a proliferare intensamente ed a formare in circa due settimane l'equivalente dello "strato germinativo" della cute *in vivo*.

Risulta pertanto chiaro che la biomembrana oggetto della presente invenzione costituisce un'impalcatura pressoché ideale per la produzione di lembi di cute bioartificiale, in cui siano simultaneamente presenti ed attivi sotto i profili metabolico e proliferativo tanto i cheratinociti quanto i fibroblasti umani.

ILLUSTRAZIONE DELLE FIGURE

Altre caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dalla lettura della descrizione seguente di una forma di realizzazione qui fornita a titolo esemplificativo e non limitativo, con l'ausilio delle figure illustrate nelle tavole allegate, in cui:

- la Figura 1 illustra l'aspetto al microscopio ottico della biomembrana ottenuta conformemente alla presente invenzione, al 12° giorno di permanenza in vitro in totale assenza di cellule umane. Sono particolarmente evidenti le fini pieghettature della membrana che ne incrementano l'area di superficie;

- la Figura 2 illustra fibroblasti normali di uomo adulto in coltura in vitro osservati al microscopio in fluorescenza dopo essere stati colorati con il fluorocromo arancio di acridina, il quale si lega agli acidi nucleici. E' facilmente osservabile al centro dell'illustrazione l'occorrenza di una placca metafasica di cromosomi in una cellula nella quale si sta verificando una divisione mitotica;



- la Figura 3 illustra fibroblasti umani adulti normali in coltura sulla membrana ottenuta conformemente alla presente invenzione, tre giorni dopo la semina. Vi si notano già gruppi ravvicinati di cellule;
- la Figura 4 illustra fibroblasti umani adulti normali in coltura su una membrana ottenuta conformemente alla presente invenzione, 6 giorni dopo la semina. Si può osservare l'addensamento di cellule e le due finissime plicature che attraversano la biomembrana lungo l'asse orizzontale;
- la Figura 5 illustra un'immagine al microscopio ottico di fibroblasti umani in coltura sulla biomembrana allestita conformemente alla presente invenzione 21 giorni dopo la semina. E' degna di nota la elevata densità raggiunta dalle cellule in monostrato e la formazione di un cospicuo aggregato cellulare a più strati, visibile sul lato destro della figura;
- le figure 6 e 7 sono rispettivamente grafici illustranti l'accumulo di urea e di lattato nel medium di crescita al quale sono stati esposti i fibroblasti umani normali coltivati sulla biomembrana allestita conformemente alla presente invenzione;
- le figure 8 e 9 illustrano due diagrammi delle curve cumulative rispettivamente consumo di glucosio e dell'accumulo del lattato prodotto e secreto da fibroblasti dermici normali isolati da quattro soggetti diversi nel corso di 21 giorni di coltura in vitro sulla biomembrana allestita conformemente alla presente invenzione;
- le Figure 10, 11, 12 e 13 illustrano le modificazioni ultrastrutturali subite dalla superficie della biomembrana allestita conformemente alla presente invenzione. Nella fattispecie, le immagini sono della biomembrana rispettivamente prima della semina, e dopo una, due e tre settimane di contatto con i fibroblasti umani. Le immagini delle figure sono state ottenute tramite il microscopio elettronico a scansione, dopo la rimozione dei fibroblasti, effettuata con una tecnica che non danneggia in alcun modo la biomembrana;



- le Figure 14 e 15 illustrano ciascuna un'immagine al microscopio ottico di cheratinociti umani normali seminati su una biomembrana ottenuta conformemente alla presente invenzione, in assenza di fibroblasti, evidenziando rispettivamente il loro classico aspetto epiteliale, i loro caratteri citologici normali;
- 5 - la Figura 16 illustra un'immagine al microscopio ottico di cheratinociti umani normali seminati su una biomembrana ottenuta conformemente alla presente invenzione, in assenza di fibroblasti, 9 giorni dopo la semina. Nell'immagine sono evidenti gli isolotti cellulari che sono ancora lontani dalla confluenza;
- le Figure 17 e 18 illustrano due immagini al microscopio ottico di cheratinociti tre
10 giorni dopo la semina su un substrato in forma di biomembrana conforme alla presente invenzione, dopo che lo stesso substrato era stato parzialmente coperto di fibroblasti umani preirradiati (6000 Rad); nella figura 18 sono visibili i loro normali caratteri citologici;
- le Figure 19 e 20 illustrano i cheratinociti rispettivamente 9 e 15 giorni dopo la
15 semina sul substrato ottenuto conformemente alla presente invenzione, in precedenza inoculato irregolarmente con fibroblasti preirradiati;
- le Figure 21 e 22 illustrano cheratinociti umani cocoltivati con fibroblasti preirradiati su di una superficie di plastica standard, nove giorni, 9 giorni dopo la semina dei cheratinociti; nella figura 22 in particolare sono osservabili i caratteri citologici delle cellule in oggetto;
- 20 - le Figure 23 e 24 illustrano due immagini al microscopio della superficie del substrato ottenuto conformemente alla presente invenzione, opposta rispetto a quella sulla quale sono stati precedentemente inoculati fibroblasti umani irradiati e non, tre giorni dopo la semina;
- la Figura 25 è una immagine al microscopio di quanto descritto relativamente alle
25 figure 23 e 24, 9 giorni dopo la semina dei cheratinociti;





- la Figura 26 illustra l'immagine al microscopio di quanto descritto relativamente alla figura 23, 15 giorni dopo la semina dei cheratinociti.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si daranno ora informazioni relative alla fibroina, al metodo sperimentale utilizzato per ottenerla, e si relazionerà inoltre sulle prove eseguite per testare l'efficacia nel raggiungimento degli scopi della presente invenzione su tre tipi di membrana, che hanno permesso di determinare quale di queste è la più adatta.

A seguire si daranno dettagli sulle procedure metodologiche adoperate per la coltura e la proliferazione di cellule tissutali specializzate di vari tipi dell'organismo umano.

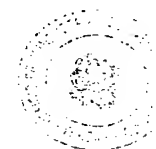
Nel paragrafo che segue verrà dunque illustrata in un certo dettaglio la fibroina, proteina naturale contenuta nella seta, pertanto prodotta dal baco da seta domestico il cui nome scientifico è *Bombyx mori*, e attualmente anche ottenibile per mezzo di tecniche di ingegneria genetica, materiale sul cui uso come substrato per la crescita, maturazione, proliferazione e differenziazione di cellule tissutali anche specializzate del corpo umano trova fondamento la brevettabilità della presente invenzione.

Il filamento serico del baco domestico si presenta formato da due monofilamenti di fibroina, proteina fibrosa, cementati insieme dalla sericina, proteina gommosa. La fibroina risulta formata da una sequenza di residui amminoacidici costituita principalmente da glicina (gly), alanina (ala), serina (ser) e tirosina (tyr).

Tali amminoacidi arrivano a costituire il 90% dell'intera molecola.

In definitiva, la struttura della componente cristallina precipitata della fibroina, come individuata dopo la metabolizzazione da parte della chemotripsina e costituente la frazione denominata Cp è:

Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-[Ser-Gly-(Ala-Gly)_n]₈-Tyr



Il rimanente 10% è una miscela irregolare per composizione e sequenza di quasi tutti i rimanenti amminoacidi, comprendente un basso contenuto di prolina ed idrossiprolina e l'assenza o quasi della cistina.

5 Queste caratteristiche distinguono la fibroina per esempio dalla cheratina e dal collagene e ne spiega alcune delle sue contrastanti proprietà meccaniche, tra le quali ha particolare rilevanza la sua inestensibilità, qualsiasi siano le condizioni ambientali nelle quali si trova.

Il peso molecolare della macromolecola è di 370 kD e risulta formata da una catena denominata L, ovvero leggera di 25 kD ed una catena denominata invece H ovvero
10 pesante, più grande, il cui peso è di 350 kD. Tali due catene sono unite tra di loro da un ponte disolfuro.

La fibroina si presenta in tre possibili differenti fasi:

la fase amorfa, anche nota come "random coil" che è solubile in acqua;

la fase α -elica, pure denominata "silk I", che è metastabile e anch'essa solubile in
15 acqua, e che, in quanto tale, è facilmente soggetta ad una transizione di fase verso la fase β -pieghettata (β -sheet), anche nota con il nome di "silk II", la quale non è solubile ed è formata da catene ad andamento parallelo unite tra di loro da legami idrogeno ed è ad elevato livello di ordine.

Il passaggio in tempi naturali di un qualsiasi sistema da una forma metastabile ad
20 una forma stabile, cioè nel caso specifico dalla forma "silk I" alla forma "silk II" richiede tempi lunghissimi, in quanto non è altro che il frutto della riorganizzazione di ogni singolo atomo nelle molecole che lo costituiscono da una situazione di più alta energia ad una situazione di più bassa energia quindi di stabilità.

Per tale motivo la natura ha provveduto a operare tale passaggio proprio durante la fase di
25 estrusione da parte del baco. Una analisi della fibroina estrusa dal baco evidenzia la



presenza al suo interno di un 55% di cristalli nella forma β -pieghettata, stabile, dispersa in una matrice amorfa: ovviamente, il percorso inverso è possibile solamente per via degradativa.

5 Attraverso la dissoluzione della fibroina è anche possibile ottenere un materiale totalmente allo stato amorfo, pertanto interamente solubile in acqua.

La complessa struttura molecolare secondaria, ove con questo termine ci si riferisce allo sviluppo delle molecole nello spazio tridimensionale, della seta può essere utilizzata per controllare specifiche interazioni in differenti ambienti chimici e meccanici.

10 La presenza e la frequenza delle diverse strutture cristalline e delle zone amorse nella molecola della fibroina possono essere modificate per stiramento, compressione o con svariati metodi chimici. L'ottimizzazione di tali procedimenti che inducono i cambi conformazionali risulta nella preparazione di membrane stabili con funzioni di barriera, di substrati per l'immobilizzazione e l'immagazzinamento di enzimi. Si veda a questo proposito di A. Kitamura et al. Application of silk fibroin to functional membranes:
15 relationship between conditions of membrane preparation, membrane potential and ion permeability. Pubblicato su Sen-I Gakkaishi, vol. 44, n. 4, 1988, pagine 193-197.

La presente invenzione viene qui descritta non limitativamente dai seguenti esempi di attuazione.

20 Dalla letteratura emerge chiaramente che le condizioni di preparazione della membrana attraverso il *casting*, ovvero la concentrazione, il solvente, il substrato, la temperatura eccetera, sono collegate alle proprietà delle membrane di fibroina che ne risultano. Tali proprietà sono il grado di cristallinità, l'assorbimento di acqua e la conformazione. Data tale relazione si sono indagati i vari parametri di preparazione, per ottenere un materiale che superasse gli iniziali problemi di fragilità ed instabilità in
25 ambiente acquoso che gli sono propri, come visto sopra.



Le condizioni e le procedure di preparazione, una volta ottimizzate, sono state standardizzate, per una più facile ripetitività e per l'ottenimento di campioni tra di loro sempre omogenei.

Ottenimento della fibroina.

- 5 La fibroina è stata ottenuta attraverso un normale processo di sgommatura:
- la seta greggia (fibroina e sericina) sotto forma di tessuto è stata tratta in una soluzione acquosa di sapone di Marsiglia alla concentrazione di 10 g/l con un rapporto bagno fibroina/soluzione saponosa di 1:100, ad una temperatura di 98°C per un'ora. In seguito i campioni sono stati lavati ripetutamente in acqua distillata e sono stati sottoposti
- 10 all'estrazione di eventuali impurità e sostanze grasse in etere di petrolio. Grazie al processo di sgommatura si elimina la sericina, una proteina gommosa che riveste le bavelle seriche.

La verifica dell'efficacia della sgommatura viene compiuta con l'osservazione al microscopio ottico del campione trattato con il colorante *blu di Coomassie*.

La preparazione delle membrane di fibroina.

- 15 Il procedimento per la preparazione delle membrane di fibroina è basato su protocolli già esistenti in letteratura, quali per esempio quello definito da N. Minoura et al. nel loro articolo intitolato: Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as biomaterial. Pubblicato su Biomaterials, Vol. 11, agosto 1990, pagg. 430-434. Questi sono stati opportunamente modificati così da ottimizzare il livello di interazione biologica
- 20 delle membrane con l'ambiente cellulare con il quale sono poste a contatto.

Si è dapprima dissolta la seta sgommata ottenuta come descritto nell'Esempio precedente in una soluzione acquosa 9 M di bromuro di litio in un rapporto peso/volume di 1 g/10 ml con la soluzione al 10%, ad una temperatura di 65°C e per 3 ore.

- 25 Si è filtrata la soluzione ottenuta attraverso un setto poroso n. 1 e la si è diluita con acqua distillata fino a portare la soluzione al 5% di rapporto peso/volume.





Si è dializzata la soluzione con acqua per 2 giorni al fine di ottenere la totale eliminazione di sale.

Si è ricorsi a tubi per dialisi Spectra/Por della Spectrum - MWCO: 3,500, dal diametro di 14 mm e con un rapporto Volume/lunghezza di 1.0 ml/cm. La membrana per dialisi selezionata aveva un taglio molecolare basso al fine di trattenere nella soluzione piccoli peptidi che si sono isolati per distacco durante le precedenti fasi e che sembrano favorire la crescita cellulare.

Si è eseguito il casting della soluzione acquosa al 5 % (p/v) a temperatura ambiente con uno stampo in polistirene.

10 Tale polimero è stato scelto per costituire lo stampo perché è stato verificato che non interferisce con la struttura del materiale (formazione di un materiale ad alta percentuale di cristallinità sul vetro), ed inoltre è stato osservato che non modifica la morfologia superficiale della membrana a contatto (come il polietilene).

15 Il prodotto ottenuto è una membrana allo stato amorfo, per cui completamente solubile in acqua. E' stata indotta la transizione dalla forma random-coil a quella stabile ed ordinata β -pieghettata desiderata con il trattamento della membrana con una soluzione acquosa di metanolo (80:100) ricorrendo ad un processo di per sè noto in letteratura e descritto da N. Minoura et al. in "Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membranes treated with methanol", Polymer, Vol. 31, febbraio 1990, pagg. 265-269.

20 **Valutazione della stabilità in ambiente acquoso dei materiali trattati in metanolo.**

Questa è stata compiuta con la misura delle proteine rilasciate in soluzione fisiologica (PBS) di cui sono stati valutati i pesi molecolari tramite analisi HPLC.

I materiali utilizzati per confronto sono un materiale di controllo, un materiale non trattato ovvero allo stato amorfo, ed un materiale trattato fisicamente con il calore.



Campione	Peso (mg)	Incubazione in PBS (ml) per 1 ora	Proteine rilasciate (mg/ml)
Controllo	4,5	1,2	0,458
200 °C	5,2	1,2	0,401
Metanolo (80%)	4,7	1,2	0,177

Dalla lettura della tabella risulta evidente come il trattamento con il metanolo sia maggiormente efficace ad indurre un cambiamento di conformazione della proteina ed una sua induzione ad acquisire lo stato β -piegheggiato, che la rende la membrana estremamente stabile in acqua in quanto causa la formazione di forti legami intermolecolari a idrogeno.

Caratterizzazione.

I parametri di caratterizzazione della molecola di fibroina ottenuta dal procedimento descritto negli esempi precedenti sono stati i seguenti:

- a) peso molecolare della fibra sgommata e della fibroina dopo le fasi di solubilizzazione e di dialisi;
- b) peso molecolare del residuo secco liofilizzato rilasciato in acqua distillata in tempi diversi da membrane ottenute con metodologie preparative diverse;
- c) angolo di contatto;
- d) misure di assorbimento dell'acqua;
- e) prove fisico-meccaniche e dinamico termico meccaniche (DMTA);
- f) Differential Scanning Calorimetry

Determinazione del peso molecolare della fibroina in cromatografia ad esclusione sterica.

I campioni di membrana di fibroina sono stati analizzati per mezzo di cromatografia valendosi della seguente strumentazione:



- Sistema HPLC Waters costituito da una pompa mod. 510, un iniettore U6K, un rivelatore UV/Vis mod. 490. Le condizioni di analisi, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono gestiti dal software cromatografico Maxima 820;
- Colonna Shodex Protein KW-804.

5 Fibroina

Dall'analisi dei risultati non si sono notate differenze significative nella distribuzione dei pesi molecolari tra i campioni di fibroina analizzati (fibra dopo sgommatura e fibroina dopo solubilizzazione con LiBr).

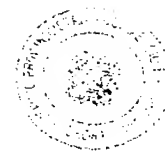
10 In entrambi i casi, le condizioni denaturanti della fase mobile hanno fatto assumere alle molecole di fibroina un volume idrodinamico molto elevato, che le ha collocate ai limiti superiori dell'intervallo di frazionamento della colonna utilizzata (peso molecolare medio apparente: 650-700 kD). Ciò è dimostrato dalla forma asimmetrica della curva di eluizione, che ha presentato una rapida salita in corrispondenza del volume di esclusione della colonna, seguita da una progressiva discesa verso la regione dei bassi pesi
15 molecolari. Non si esclude inoltre che nella soluzione si verifichino fenomeni di aggregazione intermolecolare.

Dai risultati ottenuti si può comunque concludere che la solubilizzazione con bromuro di litio non sembra abbia indotto modificazioni significative nella struttura della fibroina, il cui peso molecolare è rimasto pressoché invariato rispetto a quello della fibra di
20 partenza.

Residui

Il materiale proteico staccatosi dai film conservati in acqua per i tempi utilizzati è caratteristico, dal punto di vista cromatografico, poiché contiene in prevalenza frammenti proteici a medio-basso peso molecolare .

25 Si ritiene che si tratti di frammenti di fibroina, in particolare di peptidi provenienti



dalla subunità L a basso peso molecolare (Light chain), che si sono staccati dal film immerso in acqua a causa di vari fattori che agiscono in maniera concentrata, quali l'azione rigonfiante dell'acqua e l'estrazione-solubilizzazione delle frazioni proteiche più solubili, la probabile azione idrolitica dell'acqua, le probabili variazioni di pH, e i frammenti che si staccano dalla catena durante la fase di solubilizzazione della fibroina in sali di Litio.

Infatti, le condizioni alcaline di sgommatura possono indurre l'idrolisi parziale del ponte disolfuro che nella fibroina nativa lega le subunità H (Heavy chain) ed L. Tale ipotesi è avvalorata dalla presenza di una spalla che emerge nella regione dei bassi pesi molecolari della curva di eluizione della fibra, oltre che da esperienze precedenti (dati non pubblicati).

Angolo di contatto

E' stato misurato l'angolo di contatto dinamico (advancing and receding) utilizzando una Microbilancia Cahn mod. 322 e la tecnica di Wilhelmy. Sono stati analizzati campioni umidi (all'equilibrio) di 20x5x0.15 mm con 3 cicli di immersione e emersione a 150µm/sec in acqua distillata per HPLC (Merck) alla temperatura di 25°C.

I campioni in oggetto non hanno mostrato apprezzabili fenomeni di isteresi, e l'angolo di contatto come valore medio misurato è di $55^{\circ} \pm 3^{\circ}$.

Campioni omogenei ai precedenti ma con un minor grado di assorbimento d'acqua hanno mostrato angoli di contatto ben superiori al valore riportato precedentemente.

Da segnalare in ogni caso che il dato sperimentale da considerarsi è quello misurato su membrane di fibroina all'equilibrio, poiché riproduce una situazione fisiologica più corretta.

Prove di assorbimento in acqua distillata

Le membrane sono state pesate dopo essiccazione in stufa a 60°C e poi a tempi crescenti di incubazione in acqua distillata (15, 30, 60 minuti, 2 ore, 4 ore, 8 ore e da uno a





45 giorni).

Il massimo assorbimento d'acqua si valuta attorno al 40% in peso dopo 2 giorni di permanenza in ambiente acquoso.

Prove meccaniche

5 Sono state fatte misure relativamente alle caratteristiche meccaniche delle membrane a differenti gradi di idratazione.

Incubazione	Modulo (MPa)	Sforzo Max (MPa)	Deformazione a rottura %
5 ore	27.6 ± 4.3	3.3 ± 0.1	79 ± 12
10 gg	58.6 ± 15.4	4.0 ± 0.3	60 ± 18
20 gg	114.1 ± 2.3	5.9 ± 0.1	80 ± 35
30 gg	111.9 ± 12.4	5.7 ± 0.3	71 ± 18

10 Le curve sembrano evidenziare un aumento della resistenza del materiale all'aumentare dell'acqua assorbita.

Si potrebbe ipotizzare la perdita di sostanze con effetto plasticizzante e/o la formazione di legami intercatena che conferirebbero alla membrana caratteristiche meccaniche superiori, con una contemporanea variazione strutturale a favore della fase cristallina β -pieghettata o silk II.



Test comparativo

Si sono prodotte tre membrane, due delle quali, le membrane B e C costituite da fibroina non purificata, quindi avente in sé frazioni trascurabili di impurezze, mentre una, la membrana A, costituita da un copolimero di acido D, L-lattico al 60% in peso e di ϵ -caprolattone al 40% in peso e si è verificato quanto ognuna di esse sia adatta ad essere
5 utilizzata come substrato conformemente alla presente invenzione.

I procedimenti per l'ottenimento delle tre membrane sono enunciati a seguire.

Sintesi della membrana A.

L'acido D,L-lattico (Boehringer-Ingelheim) è stato purificato per ricristallizzazione
10 da una soluzione in etilacetato ed essiccato a 45° C sotto vuoto per 24 ore.

L' ϵ -caprolattone (Aldrich) è stato distillato sotto pressione ridotta e conservato sotto pressione di azoto.

Il polimero è stato prodotto facendo reagire i monomeri in atmosfera di azoto, usando etilesanoato di stagno come catalizzatore, in un reattore di vetro sotto agitazione a
15 120°C. Dopo la polimerizzazione, il copolimero è stato purificato per dissoluzione in acetone e successiva precipitazione in metanolo. La membrana è stata preparata per evaporazione di solvente da una soluzione del copolimero purificato in acetone, eliminando successivamente il solvente per trattamento in forno sotto vuoto.

Sintesi della membrana B.

20 La seta sgommata viene disciolta in una soluzione di bromuro di litio in acqua 9 molare, alla temperatura di 65°C per tre ore, nella concentrazione di 0,1 g/ml.

La soluzione viene successivamente filtrata su un setto poroso di ceramica e diluita con acqua distillata fino al raggiungimento di una concentrazione di 0,05 g/ml, e poi dializzata contro acqua per due giorni per eliminare il sale, con l'uso di tubi per dialisi (ad
25 esempio Spectra/Por della Spectrum -MWCO=3500, diametro= 14 mm,



Volume/Lunghezza = 1.5 ml/cm).

La soluzione viene poi versata in contenitori di polistirene e la membrana ottenuta per evaporazione dell'acqua a temperatura ambiente.

La membrana così ottenuta viene successivamente immersa in una soluzione all' 80% di metanolo in acqua per 60 secondi, al fine di renderla cristallina e così insolubile in acqua.

Sintesi della membrana C.

La seta sgommata viene disciolta in una soluzione 9 molare di bromuro di litio in acqua, alla temperatura di 65° C per tre ore, nella concentrazione di 0,1 g/ml.

La soluzione viene successivamente filtrata su un setto poroso di ceramica e diluita con acqua distillata fino al raggiungimento di una concentrazione di 0,05 g/ml, e poi dializzata contro acqua per 2 giorni per eliminare il sale, con l'uso di tubi per dialisi (ad esempio Spectra/Por della Spectrum -MWCO=3500, diametro = 14 mm, Volume/Lunghezza = 1,5 ml/cm).

La soluzione viene portata rapidamente a temperatura di congelamento in azoto liquido e poi liofilizzata.

Il liofilizzato viene disciolto in esafluoroisopropanolo con l'ottenimento di una soluzione al 5% (peso/volume) di fibroina.

La soluzione viene poi versata in contenitori di polistirene e la membrana ottenuta viene successivamente immersa in una soluzione all'80% di metanolo in acqua per 60 secondi, al fine di renderla cristallina e così insolubile in acqua.

Le tre membrane, sono state sterilizzate in ossido di etilene, poste in contatto con fibroblasti umani normali ricavati da individui adulti precedentemente informati, e sono state incubate a 37°C in un medium di crescita per un periodo di tre settimane.

Si sono compiute osservazioni a microscopio rovesciato, in luce sia normale, sia in



fluorescenza, delle colture in vitro così ottenute, mentre i terreni di crescita sono stati rinnovati ad intervalli regolari ed i terreni condizionati dalle cellule sono stati campionati e conservati a -80°C per essere poi esaminati dal punto di vista biochimico.

Con particolare riferimento alle Figure, si osserva come lo sviluppo e la proliferazione delle cellule cheratinocitiche della coltura fatta crescere sulla membrana B ottenuta conformemente alla presente invenzione sia molto evidente, e si osserva inoltre dalle figure 17-25 come la previa semina di fibroblasti irradiati e non al fine di impedirne la proliferazione che avviene a velocità doppie rispetto a quella dei cheratinociti non abbia impedito o condizionato in alcun modo il popolamento del substrato conforme alla presente invenzione di questi ultimi, anche quando essi sono stati seminati sulla faccia opposta della membrana.

Inoltre, le immagini mostrano chiaramente come le caratteristiche citologiche delle cellule costituenti le colture fatte crescere sulla superficie del substrato siano del tutto normali.

Dai risultati ottenuti e dalle comparazioni eseguite della membrana B conforme alla presente invenzione con le altre due membrane testate per efficienza si è giunti alle seguenti sorprendenti conclusioni:

la membrana B oggetto della presente invenzione e la membrana C

a) consentono una crescita cellulare più cospicua rispetto alla membrana A;

b) permettono lo svolgimento di processi metabolici di sintesi assai intensi senza attivare in modo significativo i processi proteocatabolici.

Inoltre la membrana B oggetto della presente invenzione, a confronto con la membrana C

può essere prodotta in quantità considerevoli con spese minori, avendo pertanto dei vantaggi non solo prettamente biologici, ma anche economici e rivelandosi quindi anche





più facilmente e diffusamente commerciabile.

Espressione proteica

Ancorché la morfologia dei cheratinociti ed il loro modo di aggregarsi differiscano nettamente dai fibroblasti e siano percettibili anche da un occhio non esperto, ci è parso opportuno dimostrare che sulla biomembrana secondo la presente invenzione essi esprimono delle proteine specifiche dei filamenti intermedi del citoscheletro, le citocheratine (non espresse dai fibroblasti).

Lembi di biomembrane ottenuti come descritto nell'Esempio X, su cui erano stati coltivati dei cheratinociti, sono stati cimentati con un anticorpo "pan" diretto contro le citocheratine e quindi incubati con un anticorpo secondario marcato con FITC o legato alla fosfatasi alcalina. Abbiamo così dimostrato che i cheratinociti contengono nel loro citoplasma delle citocheratine. Per contro, un anticorpo diretto contro la vimentina, la proteina tipica dei filamenti intermedi dei fibroblasti ha decorato questi ultimi in modo ben evidente senza affatto reagire con i cheratinociti. I due tipi cellulari mantengono quindi caratteristiche citospecifiche anche se coltivati sulla biomembrana oggetto della presente invenzione.

METODI DI COLTURA CELLULARE IN VITRO.

Esempio I

Metodo di coltura in vitro di cellule epiteliali squamose normali dell'epidemide, del cavo orale, della congiuntiva e della cornea di uomo e fibroblasti dei connettivi sottostanti.

Le cellule sopramenzionate possono essere isolate con tecniche consimili da campioni biotici ambulatoriali od intraoperatori dei tessuti corrispondenti (cute, mucosa orale, mucosa congiuntivale, e cornea). Come esempio per tutti verranno descritti i metodi applicati all'epidermide ed al derma ottenuti da biopsie di cute umana.

Una volta pervenuto in laboratorio, il prelievo di cute viene incubato a 4°C per una notte in



una soluzione di dispasi (0,25% p/v). La digestione enzimatica attenuata consente il distacco senza difficoltà dell'epidermide (come lamina unica) dal tessuto connettivo sottostante (derma e sottocutaneo); i due campioni di tessuto così ottenuti subiscono trattamenti distinti

5 (A) *Derma e sottocutaneo*

La procedura ha il fine di isolare i fibroblasti, che sono le cellule deputate al mantenimento della struttura del tessuto connettivo e che possono essere coltivati separatamente o cocoltivati con i cheratinociti (metodo del 'feeder layer').

10 Il campione di tessuto connettivo viene sminuzzato grazie all'azione a forbice di due bisturi in una soluzione di tripsina (0,25% p/v)-EDTA (0,02% p/v); si procede quindi alla digestione enzimatica in camera calda a 37°C con l'aiuto di un agitatore magnetico mantenuto a bassa velocità (50 rpm) per 30 minuti. Si centrifuga quindi a 600 rpm per 10 minuti a 4°C. Si decanta il supernatante, si risospende il *pellet* e si contano le cellule vitali in una camera di Neubauer. Infine, si procede alla semina dei fibroblasti previa o meno
15 irradiazione con raggi gamma (6000 rad).

(B) *Epidermide*

La procedura ha il fine di isolare i cheratinociti, che sono il principale tipo di cellule epiteliali della cute. Con delicatezza e velocità si sminuzza la sottile lamina epidermica in una soluzione di tripsina (0,25% p/v). Si aggiunge uno specifico inibitore della tripsina e si
20 centrifuga a 600 rpm per 10 minuti a 4°C. Si decanta il supernatante, si risospende il *pellet* e si contano le cellule vitali in una camera di Neubauer. Infine, si procede alla semina dei cheratinociti.

Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività
- 25 2. *Flask* di plastica con superficie come sopra rivestita o meno da uno strato di fibroblasti



irradiati

3. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti) con la superficie superiore rivestita o meno da uno strato di fibroblasti normali o preirradiati con 6000 rad

4. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti) con la superficie inferiore (cioè quella opposta alla superiore) rivestita o meno da uno strato di fibroblasti normali o preirradiati con 6000 rad

Terreno di coltura

Si impiega di routine il medium 3MCDB153:1 (composto da tre parti di Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DMEM] ed una parte di Medium F12), cui sono addizionati siero bovino fetale (10% v/v), antibiotici (soluzione di penicillina-streptomicina all'1% p/v), *epidermal growth factor* (EGF; 0,1 µg/ml), insulina (20 ng/ml), estratto pituitarico (PTE; 30 µg/ml), idrocortisone (0,5 µg/ml). Il medium è sostituito giornalmente o ogni due giorni con dell'altro fresco della medesima composizione.

Evoluzione delle colture

I fibroblasti umani normali proliferano rapidamente formando dapprima un monostrato continuo di cellule tra loro parallele e quindi un polistrato con cellule non sempre disposte parallelamente. Nel contempo i fibroblasti depositano sui supporti di coltura quantità crescenti dei componenti della matrice extracellulare e dei precursori delle fibre collagene, che sono quindi integrati in fascetti di fibre di dimensioni anche cospicue. I fibroblasti consumano avidamente il glucosio presente nel terreno di coltura e, in modo tipico, riversano in quest'ultimo quantità assai cospicue di acido lattico. Nel citoplasma dei fibroblasti sono presenti sia filamenti intermedi costituiti da vimentina sia il *marker* citotipico decorina.

I cheratinociti umani normali proliferano rapidamente a partire da minuti *cluster* iniziali e costituiscono un monostrato di cellule epiteliali piccole e strettamente aderenti. Hanno un



tempo di ciclo mitotico di circa 48 ore e nel loro citoplasma sono presenti filamenti intermedi formati dalle cosiddette citocheratine "leggere" (sinché le cellule proliferano attivamente) o "pesanti" (quando le cellule differenziano). Se portati alla superficie del terreno di crescita, i cheratinociti formano un polistrato le cui cellule superficiali finiscono per entrare in differenziazione postmitotica terminale (*diffpoptosis*). La *diffpoptosis* è innescata anche se le cellule sono private dell'EGF per più di 48 ore consecutive. La velocità di crescita dei cheratinociti è molto più intensa se sul fondo della *flask* o dall'altra parte del supporto di coltura sono presenti fibroblasti umani o di roditore preirradiati o meno.

10

Esempio II

Metodo di coltura in vitro di astrociti normali di uomo adulto.

Gli astrociti sono elementi di supporto dei neuroni e si isolano da campioni bioptici intraoperatori (ad es. di corteccia cerebrale del lobo temporale). Una volta pervenuto in laboratorio, il tessuto nervoso viene tagliato in minuti frammenti, sottoposto a blanda digestione enzimatica con tripsina (0,25% p/v) in Hanks' Basal Salt Solution (BSS) a temperatura ambiente (18° C) e, infine, dissociato meccanicamente aspirando ripetutamente i frammenti di tessuto con pipette Pasteur la cui bocca abbia un diametro progressivamente decrescente. Le cellule così isolate sono seminate in *flask* da coltura e fatte proliferare in un medium *ad hoc* (*vide infra*). Inizialmente la loro crescita è molto lenta. Una volta raggiunta una confluenza del 70%, si procede al distacco delle cellule nervose con una soluzione di tripsina (0,25% p/v)-EDTA (0,02% p/v) in BSS ed alla semina in nuove *flask*. La procedura viene ripetuta più volte nel corso di diversi mesi.

20

Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività

25

2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)





Terreno di coltura

Viene impiegato di routine il medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con siero bovino fetale (FCS; 10% v/v), antibiotici (soluzione di penicillina-streptomicina 1% v/v), *basic fibroblast growth factor* (bFGF; 20ng/ml), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1; 20ng/ml), *platelet-derived growth factor* (PDGF; 20ng/ml), *epidermal growth factor* (EGF; 10 nM), β -estradiolo (10 nM) e tossina colerica (10 nM). Il medium viene rinnovato ogni 2-4 giorni con dell'altro fresco di identica composizione.

Evoluzione delle colture

Quando proliferino attivamente, gli astrociti normali di uomo adulto si presentano come delle cellule piccole, di forma poligonale e di aspetto epiteliosimile che in seguito possono differenziare, piuttosto che continuare a proliferare, andando incontro al fenomeno della *stellation*, cioè l'emissione di numerosi prolungamenti citoplasmatici riccamente arborizzati. Un ritmo frequente nei cambi di medium previene la *stellation* mentre mantiene un'intensa attività proliferativa; effetti diametralmente opposti hanno i cambi di medium molto dilazionati l'uno dall'altro. Gli astrociti esprimono comunque dei *marker* citotipici, come la *glial fibrillary acid protein* (GFAP) e la proteina GAP-43, rivelabili con l'immunoistochimica e con il Western *immunoblotting*. Nelle colture protratte gli astrociti umani formano delle reti assai intricate di prolungamenti cellulari finemente arborizzati che si sovrappongono in più piani.

Esempio III

Metodo di coltura in vitro di cellule epiteliali squamose (mesoteliali) normali delle membrane sierose di uomo adulto

Le cellule mesoteliali umane sono isolate mediante dissociazione enzimatica da biopsie intraoperatorie delle membrane sierose (pleura, pericardio, peritoneo). Come esempio per tutti, faremo riferimento alle procedure applicate ad un campione bioptico di grande



omento (peritoneo).

Una volta pervenuto in laboratorio, il frammento biotico viene lavato accuratamente in soluzione fisiologica. La digestione enzimatica viene effettuata con una soluzione dissociante contenente tripsina (0.125% p/v) ed EDTA (0.02% p/v) in Hanks' Basal salt

- 5 Solution (BSS). La digestione va effettuata in camera calda (a 37°C) mantenendo il tessuto in lenta agitazione (40 rpm) per 25 minuti. Si centrifuga quindi il sovrnatante ottenuto a 1700 rpm per 5 minuti a 4° C. Si procede quindi alla risospensione, conta e, infine, semina delle cellule epiteliali formanti il pellet. Si può procedere ad ulteriori cicli di digestione enzimatica del tessuto rimasto dopo il primo ciclo dissociante. Tuttavia, ciò comporta il
- 10 pericolo di isolare i fibroblasti omentali piuttosto che le cellule mesoteliali. Al termine di questi cicli di dissociazione cellulare, il tessuto rimasto viene tagliato in minuti frammenti che sono pure inoculati in *flask* da coltura.

Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata per accrescerne l'adesività
- 15 2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

Terreno di coltura

- Il medium di crescita utilizzato per la coltura delle cellule squamose del mesotelio umano ha la seguente composizione: Ham's F12 arricchito di siero bovino fetale (FBS, 10% v/v), antibiotici (soluzione di penicillina-streptomina: 1% p/v), insulina (0,5 µg/ml),
- 20 glutammina (2 mM), transferrina umana ferro-satura (0,5 µg/ml), idrocortisone (0,4 µg/ml) e tossina colerica (10 ng/ml). Il medium viene rinnovato ogni 4 giorni con dell'altro fresco di identica composizione.

Evoluzione delle colture

- Le cellule epiteliali del mesotelio peritoneale umano inizialmente hanno delle ridotte
- 25 dimensioni e si raggruppano in piccoli *cluster* tra i quali si intercalano sporadici



fibroblasti. Le cellule proliferano attivamente generando elementi di forma poligonale e con citoplasma ricco di organuli le cui dimensioni si accrescono col tempo e che finisce col vacuolarsi fortemente. Tra le cellule epiteliali di crescenti dimensioni e sovente binucleate che formano delle lamine sempre più estese ma sempre monostratificate permangono alcuni nidi, che possono unirsi tra loro a rete, di piccole cellule attivamente proliferanti. I pochi fibroblasti iniziali non proliferano ma muoiono per apoptosi a meno che la loro crescita non venga favorita.

Esempio IV

Coltura in vitro di cellule normali della linea osteoblastica di uomo adulto.

10 Frammenti biotici intraoperatori di tessuto osseo delle ossa mascellari o delle restanti ossa dello scheletro umano sono sottoposti a ripetuti lavaggi in *phosphate buffered saline* soluzione A (PBS/A) prima di subire due cicli di predigestione con collagenasi di tipo II (0,5 mg/ml) per 45 minuti a 37°C. I frammenti ossei vengono quindi sminuzzati con un *bone cutter* e posti in coltura in piastre tipo cluster da 12 pozzetti ciascuna.

15 Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività

2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

Terreno di coltura

Il medium di crescita utilizzato per la coltura *in vitro* delle cellule della linea osteoblastica umana ha la seguente composizione: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) arricchito di siero bovino fetale (FBS, 10% v/v), antibiotici (soluzione di penicillina-streptomina: 1% p/v), ascorbato di sodio (50 µg/ml) e schegge di vetro al borosilicato. Il medium viene rinnovato ogni 4 giorni con dell'altro fresco di identica composizione. L'aggiunta al medium sopra menzionato di β-glicerofosfato e di agenti come le vitamine A
25 e D₃ esercita un effetto differenziante (piuttosto che mitogenico soltanto) sulle cellule della



linea osteoblastica.

Evoluzione delle colture

Dopo le prime due settimane di permanenza *in vitro*, le cellule che migrate all'esterno dei frammenti di osso sono distaccate mediante tripsinizzazione (tripsina al 0,25% p/v) dalle
5 schegge di vetro al borosilicato alle quali hanno per lo più aderito e seminate su *flask* da coltura in plastica impiegando ancora il DMEM addizionato con FBS ed ascorbato. Successivamente le cellule possono essere passate, previa un'ulteriore tripsinizzazione, su qualunque altro tipo di supporto. Le cellule osteoblastiche formano dapprima dei monostrati in cui la disposizione dei diversi elementi porta alla creazione di vortici che si
10 fanno sempre più marcati quando col tempo le cellule, aumentando progressivamente di numero, formano dei polistrati. Inizialmente le cellule proliferanti non esprimono il loro marker plasmalemmatico specifico, cioè l'enzima fosfatasi alcalina. Questo compare in una fase successiva e continua ad essere espresso con intensità diverse dalle varie cellule osteoblastiche, in parallelo con il loro attuale grado di differenziazione. Le cellule più
15 mature quasi non proliferano più ma secernono nel medium i precursori delle fibre collagene ed i componenti della matrice extracellulare tra cui l'osteocalcina e l'osteonectina. Infine, si manifestano dapprima in modo focale e quindi diffusamente i processi di calcificazione delle strutture extracellulari che possono essere talmente intensi da portare alla formazione *in vitro* di strutture molto simili all'osso.

20

Esempio V

Coltura in vitro di epatociti normali di fegato di ratto neonato.

Gli epatociti di ratto neonato si isolano mediante una dissociazione combinata, enzimatica e meccanica del fegato di animali di età non superiore ai 4 giorni. Dopo il sacrificio degli animali portato a termine con tecnica indolore, il prelievo dei fegati viene effettuato
25 usando un apposito tavolino chirurgico raffreddato in modo da mantenere al minimo il





consumo di ossigeno da parte del tessuto epatico. Una volta estratto, ciascun fegato viene tagliuzzato in pezzetti del volume di 2-3 mm³ circa. I blocchetti di tessuto vengono lavati più volte in soluzione fisiologica. Quindi si procede alla digestione con una soluzione composta da collagenasi di tipo II (5 mg/ml), ialuronidasi testicolare ovina (5 mg/ml), tripsina (0,02% p/v), nella quale i pezzetti di fegato sono mantenuti in lenta agitazione per 15 minuti. Alla fine del primo ciclo di digestione enzimatica, si preleva la fase liquida e si blocca in essa l'attività degli enzimi con l'aggiunta di inibitori delle proteasi e di siero bovino adulto (FCS, 20% v/v) prima di conservarla a 4° C. Quindi, si ripete per quattro-cinque volte il ciclo di dissociazione enzimatica conservando a 4° C i corrispondenti supernatanti. Alla fine, i pezzetti di fegato ormai "ammorbiditi" dall'incubazione con le proteasi vengono fatti passare più volte attraverso la bocca di diametro progressivamente decrescente di pipette Pasteur preparat *ad hoc*. Questa azione meccanica libera in modo pressoché completo le cellule epatiche dalla trama connettivale di sostegno. Le frazioni ottenute per dissociazione enzimatica e meccanica sono mescolate e centrifugate a 600 rpm per 5 minuti a 4°C. Le cellule del pellet così ottenuto vengono risospese e contate. Infine, gli epatociti sono separati dalle cellule stromali mediante l'impiego di un gradiente di PercollTM prima di essere seminati sui supporti di coltura.

Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività
- 20 2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)
3. Dischetti di polietilene atossico ultrasottile (37,5 µm di spessore) e poroso

Terreno di coltura

Il medium di crescita utilizzato per gli epatociti neonatali di ratto è l' $\text{HiWo}_5\text{Ba}_{2000}$, al quale nelle prime ore si aggiungono siero bovino fetale (FBS, 10% v/v) e antibiotici (soluzione di cefaloridina-streptomicina allo 0,1% p/v).



Evoluzione delle colture

Impiegando il Percoll™ si allestiscono delle colture in cui gli epatociti neonatali formano almeno il 98% della popolazione cellulare totale. Le cellule si raggruppano in isolotti omogenei in strati singoli e, in genere, già dopo 24-48 ore mostrano la ricostituzione dei canalicoli biliari. Una frazione modesta (15% circa) degli epatociti prolifera spontaneamente nelle colture ed un 10% circa delle cellule muore ogni giorno *in vitro* per apoptosi spontanea. Questo fa sì che in condizioni basali la popolazione epatocellulare *in vitro* mantenga delle dimensioni quasi costanti o cresca solo di poco anche per oltre 30 giorni. L'aggiunta all' $\text{HiWo}_5\text{Ba}_{2000}$ privo di siero di fattori di crescita, come l'*epidermal growth factor* (EGF), il *transforming growth factor- α* (TGF- α), l'*hepatocyte growth factor* (HGF), gli ormoni pancreatici (insulina e glucagone), gli esterî del forbolo e l'adenosinmonofosfato 3',5'-ciclico (cAMP) accresce le dimensioni della frazione epatocellulare proliferante e, in parallelo, della popolazione epatocellulare. La crescita dei pochi elementi stromali presenti all'inizio nelle colture viene prevenuta dall'impiego del terreno selettivo $\text{HiWo}_5\text{Ba}_{2000}$ il quale è privo dell'aminoacido essenziale arginina, che le cellule connettivali non sono in grado di sintetizzare. Gli epatociti neonatali di ratto producono *ex novo* e secernono nel medium di crescita nel corso di quattro settimane di permanenza *in vitro* dei *marker* citospecifici come l'albumina, il fibrinogeno ed altre globuline del plasma oltre a captare specificamente la ^3H -bilirubina.

Esempio VI

Coltura di cellule steroidosecernenti della corteccia surrenale normale di uomo adulto

Porzioni di tessuto surrenalico normale sono prelevate, previo consenso informato, da pazienti adulti in corso di interventi per asportazione simultanea del rene e del surrene dello stesso lato. Il tessuto ghiandolare viene decapsulato per eliminare la zona



glomerulosa e quindi posto in un contenitore di tipo universale (volume = 25 ml) contenente 10 ml di Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) con aggiunto siero bovino adulto (FCS, 20 % v/v) inattivato a 56° C per 30 minuti e, infine, fatto pervenire al laboratorio entro un vaso Dewar contenente del ghiaccio fondente. Le procedure per la

5 coltura del tessuto corticosurrenalico sono iniziate entre 30 minuti-6 ore dal prelievo. Il tessuto è trasferito in una capsula di Petri (diametro: 10 cm) contenente 10 ml di *phosphate buffered saline* soluzione A (PBS/A) freddo (4°C), sterile. Il tessuto viene tagliato in pezzetti con lati di 4-5 mm, sottoposto a lavaggi ripetuti con PBS/A sterile per asportarne il contenuto ematico, ed infine trasferito in una fiasca di Erlenmeyer da 50 ml contenente

10 una soluzione di tripsina (0,2% p/v), collagenasi tipo I (0,5% p/v) e ialuronidasi testicolare ovina (0,4 % p/v). Il pH è aggiustato a 7,3-7,4 aggiungendo un piccolo volume di una soluzione di NaHCO₃ (8% p/v). La mistura istolitica viene riscaldata alla temperatura ambiente (18° C). I pezzetti di tessuto sono lasciati riposare senza alcuna agitazione nella soluzione disaggregante per 30 minuti. Quindi sono sottoposti a quattro cicli successivi di

15 agitazione magnetica (100 ± 20 rpm) della durata di 20 minuti ciascuno. I diversi supernatanti sono prelevati, mescolati con inibitori delle proteasi e siero bovino adulto inattivato (FCS, 20% v/v) e conservati a 4° C. I residui pezzetti di tessuto sono trasferiti in una piastra di Petri per esservi sminuzzati con due bisturi. I supernatanti ed i frammentini di tessuto sono mescolati, centrifugati due volte a 50 g. Le cellule nei pellet residui sono

20 **Supporti impiegati per le colture in vitro**

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività
2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)
3. Dischetti di polietilene atossico ultrasottile (37,5 µm di spessore) e poroso

Terreno di coltura

25 Il terreno di coltura impiegato è l'Eagle's MEM, con aggiunto siero bovino fetale inattivato



(20% v/v), cefaloridina (50 µg/ml), streptomicina (50 µg/ml) e nystatina (25 UI/ml). In alternativa viene usato il medium $\text{HiWo}_5\text{Ba}_{2000}$ privo di siero ma con aggiunti gli stessi antibiotici appena menzionati. Al medium può essere addizionato anche un fattore trofico-differenziativo specifico per le cellule corticosurrenaliche, cioè l'ormone
5 adrenocorticotropo (ACTH) nella sua forma intera (ammino acidi 1-39) o raccorciata (ammino acidi 1-24).

Evoluzione delle colture

In assenza di ACTH le cellule delle *zonae fasciculata e reticularis* della corteccia surrenalica assumono un aspetto per lo più fibroblastosimile, perdono gran parte delle
10 caratteristiche ultrastrutturali e funzionali che solo loro proprie e possono andare incontro ad apoptosi. L'aggiunta di ACTH al medium stimola i processi proliferativi ed insieme induce rimarchevoli effetti di differenziazione ultrastrutturale (proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio, differenziazione delle *cristae* tubulovescolari dei mitocondri, ipertrofia dell'apparato di Golgi e riduzione delle goccioline lipidiche) ed
15 un'intensificazione dei processi steroidogenetici e della secrezione di composti ormonali steroidei. Dopo sette giorni di trattamento con ACTH le cellule *in vitro* sono in tutto e per tutto simili a quelle delle zone corrispondenti della corteccia surrenalica *in vivo*.

Esempio VII

Coltura di tenociti (fibroblasti tendinei) normali di uomo adulto

20 La procedura ha il fine di isolare i tenociti o fibroblasti residenti nei tendini - strutture formate da tessuto connettivo fibroso denso con un elevatissimo contenuto di fibre collagene.

Il campione di tendine prelevato in sede intraoperatoria con il consenso informato del paziente viene mantenuto a 4°C sinché non perviene in laboratorio. Qui viene subito
25 trasferito in una capsula di Petri e sminuzzato grazie all'azione a forbice di due bisturi





molto taglienti. I frammenti sono sottoposti a digestione enzimatica in una soluzione di tripsina (0,25% p/v), collagenasi di tipo I (3% p/v) e ialuronidasi testicolare ovina (0,25% p/v) in camera calda a 37°C con l'aiuto di un agitatore magnetico mantenuto a bassa velocità (50 rpm) per 30 minuti. Si centrifuga quindi la frazione a 600 rpm per 10 minuti a 4°C. Si decanta il supernatante, si risospende il *pellet* e si contano le cellule vitali. Infine, si procede alla semina dei tenociti.

Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività
2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

10 Terreno di coltura

Il terreno di coltura impiegato è il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con l'aggiunta di siero bovino fetale inattivato (20% v/v), cefaloridina (50 µg/ml), streptomicina (50 µg/ml) e nystatina (25 UI/ml). Al medium possono essere addizionati anche *platelet derived growth factor* (PDGF) e *fibroblast growth factor* (FGF).

15 Evoluzione delle colture

I tenociti umani normali proliferano rapidamente formando dapprima un monostrato continuo di cellule che si dispongono parallelamente tra loro e quindi un polistrato con cellule parallele che formano dei vortici a passo piuttosto lungo. Nel contempo i tenociti depositano sui supporti quantità cospicue di precursori delle fibre collagene di tipo I che sono quindi integrati in fascetti di fibre anche di dimensioni notevoli. Nel citoplasma sono presenti i precursori delle fibre collagene di tipo I, decorina e filamenti intermedi costituiti di vimentina. Come altri fibroblasti, i tenociti consumano avidamente il glucosio presente nel terreno di coltura e, in modo tipico, riversano in quest'ultimo quantità assai cospicue di acido lattico.



Coltura di condrociti normali di uomo adulto

Frammenti di cartilagine articolare sono ottenuti in sede intraoperatoria od ambulatorialmente da pazienti che hanno dato il loro consenso informato. Il tessuto è mantenuto a 4° C sino all'arrivo al laboratorio. Qui è traseinto in una capsula di Petri e ridotto in frammenti di 1-3 mm³ dall'azione di due lame da bisturi molto taglienti. I condrociti (o cellule cartilaginee) sono inglobati in una matrice extracellulare alquanto viscosa. Pertanto, i frammenti cartilaginei sono immersi in 5 ml di una soluzione di ialuronidasi testicolare ovina (0,5% p/v) in Hanks' Basal Salt Solution (BSS) per 15-20 minuti a temperatura ambiente (18° C). Si procede quindi al lavaggio dei frammenti in BSS ed al loro trasferimento in una fiasca di Erlenmeyer contenente 5 ml di una soluzione di tripsina (0,2% p/v) che viene agitata lentamente per 30 minuti. Si elimina il supernatante e si aggiungono 5 ml di una soluzione di collagenasi (0,25% p/v) in BSS. Dopo 30 minuti di incubazione a 37° C, si elimina il supernatante, si aggiungono altri 5 ml di una soluzione di collagenasi (0,25% p/v) in BSS e si incubano i frammenti per 120 minuti a 37° C. Si aspirano i frammenti predigeriti con delle pipette Pasteur la cui bocca abbia un diametro progressivamente decrescente. Il supernatante viene infine rimosso e centrifugato a 600 g per 9 minuti. Le cellule così sedimentate sono centrifugate nuovamente dopo risospensione in BSS. Le cellule isolate sono quindi risospese, contate e quindi seminate sui supporti di coltura.

Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività

2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

Terreno di coltura

Il terreno di coltura impiegato è l'Ham's F12 con l'aggiunta di siero bovino fetale (FCS,

15% v/v), penicillina (100 U/ml), streptomicina (100 U/ml) e Mg²⁺ (2,3 mM).



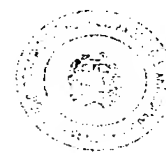
Evoluzione delle colture

I condrociti umani coltivati su substrati bidimensionali appaiono come cellule fusiformi che proliferano rapidamente formando dei monostrati confluenti di cellule per lo più disposte tra loro in parallelo. Sugli stessi substrati la produzione di elementi costitutivi della matrice extracellulare e di collagene di tipo II è alquanto limitata. Solo la coltura su supporti tridimensionali consente alle cellule, mentre la loro attività proliferativa si attenua progressivamente, di differenziare e di produrre quantità notevoli di elementi istotipici (glicosaminoglicani ecc.) della matrice extracellulare e di fibre collagene di tipo II.

Esempio IX

10 Coltura di preadipociti normali di uomo adulto

Il campione di tessuto adiposo bianco, prelevato previo consenso informato del paziente in sede di intervento chirurgico, viene ripetutamente lavato con *phosphate buffered saline* soluzione A (PBS/A) per rimuovere la maggior parte del sangue in esso contenuto, quindi tagliato in pezzetti di circa 10 mg di peso ciascuno, i quali sono sottoposti ad una prima
15 digestione enzimatica con una soluzione disaggregante — costituita da *phosphate buffered saline* soluzione A (PBS/A, 10mM), collagenasi tipo I (1,5 mg/ml), albumina sierica bovina (BSA, 20 mg/ml) — per 30-40 minuti a 37° C, in continua agitazione. Il rapporto fra peso del tessuto adiposo e volume della soluzione disaggregante è di 1g/4 ml. Successivamente, i pezzetti predigeriti di tessuto adiposo sono filtrati attraverso una rete di
20 nylon munita di pori del diametro medio di 250 µm, e quindi sottoposti ad una seconda digestione enzimatica con la soluzione disaggregante per altri 30 minuti a 37° C, e infine filtrati nuovamente attraverso rete di nylon come sopra descritto. Le due sospensioni cellulari così ottenute sono quindi mescolate e centrifugate a 200 g per 10 minuti. Per eliminare gli eritrociti, che a questo punto costituiscono il principale elemento
25 contaminante, la sospensione cellulare viene trattata con un *erythrocyte lysing buffer* (ELB:



NH₄Cl 154 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0.1 mM) a temperatura ambiente (18-20° C) per 10 minuti, e successivamente filtrata attraverso una rete di nylon con pori del diametro medio di 150 µm. Dopo lavaggi e centrifugazioni (a 200 g per 10 minuti) ripetute, le cellule isolate vengono risospesi, contaminate e infine seminate sui supporti di coltura.

5 Supporti impiegati per le colture in vitro

1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività
2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

Terreno di coltura

Il terreno di coltura impiegato per i preadipociti umani è una combinazione a rapporto definito di Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e di Ham's F12 (1:1 v/v), contenente penicillina (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) e siero bovino fetale (FBS, 10% v/v).

Evoluzione delle colture

Per rimuovere il *debris* cellulare, le colture sono lavate con PBS/A dopo un periodo di incubazione di 16-20 ore. A questo punto viene somministrato il terreno di crescita fresco per preadipociti (DMEM/ Ham's F12 1:1 vol/vol con aggiunti NaHCO₃ 15 mM, HEPES 15 mM, biotina 33 µM, acido pantotenico 17 µM, transferrina umana ferro-satura 10 µg/ml, penicillina 100 U/ml e streptomycin 0,1 mg/ml).

I preadipociti presentano una morfologia similfibroblastica ma emettono numerose espansioni citoplasmatiche, spesso velamentose. Essi proliferano, dapprima lentamente in seguito in modo più rapido, ma nelle condizioni sinora descritte non differenziano. Per indurre e mantenere la differenziazione adiposa, la quale implica il blocco irreversibile dell'attività proliferativa e l'accumulo progressivo di lipidi nel citoplasma sino al raggiungimento dell'aspetto a castone di anello tipico degli adipociti maturi, le colture di preadipociti vanno trattate con i seguenti composti da aggiungere al medium di crescita:





cortisolo (100 nM), insulina (66 nM), triiodotironina (0,2 nM) e, per i primi tre giorni, con isobutilmetilxantina (IBMX, 0,25 mM).

Esempio X

Coltura di cellule muscolari lisce di uomo adulto

- 5 Le cellule muscolari lisce possono essere isolate dalle tonache muscolari di visceri cavi (ad es., l'intestino) o di vasi sanguigni (ad es., le arterie di vario calibro e sede e le vene della metà inferiore del corpo di soggetti adulti). Le tonache muscolari viscerali o vascolari sono isolate da prelievi intraoperatori (previo consenso informato dei donatori), poste in vasi Dewar a 4° C ed inviate al laboratorio. Qui, i campioni sono lavati ripetutamente con
- 10 *phosphate buffered saline* soluzione A (PBS/A) per rimuovere il sangue in essi contenuto, tagliati in pezzetti del volume di 1-2 mm³ e, infine, sottoposti a cicli ripetuti di digestione enzimatica. La soluzione dissociante è costituita da Hanks' Basal Salt Solution (BSS) contenente tripsina (0,25% p/v) e collagenasi (5% p/v). La dissociazione è effettuata a temperatura ambiente (18° C) con lenta ma costante agitazione (60 rpm). I supernatanti
- 15 sono addizionati con antiproteasici e siero bovino adulto (FCS, 20% v/v), conservati a 4° C, mescolati insieme ed infine centrifugati a 100 g per 4 minuti. I pellet sono lavati in BSS e ricentrifugati più volte. Infine le cellule isolate sono risospese, contate ed inoculate sui supporti di coltura.

Supporti impiegati per le colture in vitro

- 20 1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività
2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

Terreno di coltura

Il terreno di coltura impiegato è il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con penicillina (100 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) e siero bovino fetale

25 (FBS, 10% v/v).



Evoluzione delle colture

Le cellule muscolari lisce hanno un aspetto fusiforme, sono mononucleate e proliferano attivamente *in vitro* sino a formare tappeti confluenti in monostrato. Esse esprimono isoforme specifiche dell'actina. Possono essere subcoltivate facilmente previo distacco con

5 soluzione di tripsina (0,25% p/v) in Hanks' BSS.

Esempio XI

Coltura di cellule endoteliali normali dei vasi sanguigni

Le cellule endoteliali formano una lamina monostratificata di cellule epiteliali squamose che riveste la superficie interna dei vasi sanguigni di vario calibro. Le cellule
10 endoteliali umane sono in genere isolate da prelievi intraoperatori (previo consenso informato) dei vasi ombelicali o di tessuto dermico o di tessuto adiposo. In questa sede ci limitiamo a descrivere il metodo del loro isolamento dai vasi ombelicali.

Sezioni di 10 cm di questi vasi, prelevate asepticamente sono poste in vasi Dewar con del ghiaccio fondente e portate al laboratorio. Qui una delle estremità del vaso viene legata ad
15 una siringa dalla quale viene dapprima fatto fluire del *phosphate buffered saline* soluzione A (PBS/A). Quindi si riempie il vaso ombelicale di soluzione dissociante (contenente collagenasi 0,25% p/v in Hanks' Basal Salt Solution [BSS]), lo si clampia all'estremità libera e lo si fa incubare per 20 minuti a temperatura ambiente (18° C). Si toglie il clampaggio, si preleva la soluzione dissociante e la si riversa, insieme con il PBS/A usato
20 per un successivo lavaggio della superficie interna del vaso, in una provetta conica e si centrifuga per 5 minuti a 4° C a 100 g. Si risospendono le cellule isolate in BSS e si ricentrifugano per due volte. Infine, le cellule sedimentate si contano e si applicano sui supporti di coltura.

Supporti impiegati per le colture in vitro

25 1. *Flask* di plastica con superficie trattata o meno per accrescerne l'adesività



2. Membrane di fibroina (pura o combinata con altri composti)

Terreno di coltura

Il terreno di coltura di solito impiegato per le cellule endoteliali è il Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con penicillina (100 U/ml), streptomicina (0.1 mg/ml) e siero bovino fetale (FBS, 10% v/v). Allo stesso fine può essere usato anche il Medium 199 od il medium RPMI, cui siano fatte le medesime aggiunte. Le cellule endoteliali umane richiedono anche la presenza nel terreno colturale di mitogeni endoteliali di derivazione ipotalamica (25 µg/ml) e di eparina (90 µg/ml).

Evoluzione delle colture

Le cellule endoteliali umane presentano in coltura un aspetto triangolare o poligonale a margini rilevati che è tipico per la diffrazione luminosa che gli si associa. Esse proliferano più intensamente se nel medium si aggiunge siero umano (sino al 20% v/v) anziché bovino oltre ai fattori sopra menzionati. Le cellule formano un tappeto monostratificato continuo che occupa, ad un certo momento, l'intera superficie del supporto di coltura. A quel punto possono essere subcoltivate mediante tripsinizzazione (tripsina 0,25% p/v in BSS) standard. Le cellule endoteliali umane producono tipicamente fattore VIII ed esprimono antigeni specifici di superficie, tutti rilevabili con tecniche di immunocitochimica. Esse esprimono anche l'enzima convertente l'angiotensina e captano le lipoproteine di bassa densità acetilate, come è facilmente rilevabile con metodi biochimici. La proliferazione delle cellule endoteliali si arresta spontaneamente se le si lascia raggiungere la confluenza (esempio di inibizione da contatto).

L'invenzione è stata precedentemente descritta con riferimento ad alcune sue particolari forme di realizzazione.

E' tuttavia evidente che l'invenzione non è limitata a tali forme di realizzazione, ma essa comprende tutte le modifiche e varianti che potranno essere considerate e che non

richiedano l'applicazione di alcuno sforzo inventivo, pertanto senza per questo uscire dall'ambito della presente invenzione come rivendicata.

Conformemente ad altre preferite forme di realizzazione il substrato è costituito da una miscela di polimeri biodegradabili nei quali la fibrina è presente in una quantità in peso variabile tra 0% e 100%.





RIVENDICAZIONI

1. Substrato adatto allo sviluppo, alla proliferazione ed alla corretta differenziazione di cellule tissutali specializzate del corpo umano, substrato costituito da un materiale che sia biocompatibile e bioriassorbibile in tempi determinabili, per l'ottenimento di una integrazione completa del tessuto trapiantato e di una integrazione ottimale con gli altri sistemi cellulari e con le loro funzioni nell'organismo nel quale il trapianto o l'impianto sono stati effettuati, il detto substrato comprendendo una miscela e/o combinazione di polimeri naturali e/o sintetici, caratterizzato dal fatto che nella detta miscela e/o combinazione è compresa la fibroina.
2. Substrato secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la detta fibroina è di origine naturale.
3. Substrato secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che la detta fibroina è secreta dal baco da seta *Bombyx Mori*.
4. Substrato secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la detta fibroina è di origine sintetica.
5. Substrato secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che la detta miscela contiene fibroina in forma pura.
6. Substrato secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4, caratterizzato dal fatto che la miscela contiene fibroina in forma funzionalizzata.



7. Substrato secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che la fibroina ricopre uno scheletro di supporto, vantaggiosamente in modo uniforme, essendo il detto scheletro di supporto costituito da una ceramica, da un metallo e/o da un materiale polimerico di origine sintetica e/o naturale e da loro eventuali combinazioni.

8. Substrato secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la fibroina viene fatta depositare sul detto scheletro di supporto.

9. Substrato secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la superficie del detto scheletro di supporto viene funzionalizzata con fibroina.

10. Substrato secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che la fibroina è presente nel detto substrato in una quantità variabile tra il 20% e l'80% in peso.

11. Substrato adatto allo sviluppo, alla proliferazione ed alla corretta differenziazione di cellule tissutali specializzate del corpo umano, costituito da un materiale che sia biocompatibile e bioriassorbibile in tempi determinabili, al fine di reintegrare col trapianto o con l'impianto il tessuto perduto e di una integrazione ottimale con gli altri sistemi cellulari e con le loro funzioni nell'organismo nel quale il trapianto o l'impianto sono stati effettuati caratterizzato dal fatto di essere costituito da fibroina pura.



12. Substrato secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che su di esso sono seminate cellule tissutali del corpo umano allo scopo di favorirne la crescita, le dette cellule tissutali comprendendo quelle della pelle, le cellule mesoteliali, gli astrociti, gli osteoblasti umani dello scheletro, i tenociti o fibroblasti umani, i condrociti o le cellule isolate dal tessuto cartilagineo, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, le cellule steroidosecernenti della corteccia surrenalica, le cellule muscolari lisce della tonaca muscolare dell'intestino e dei vasi sanguigni, le cellule dell'epitelio squamoso del cavo orale o della congiuntiva/cornea, e/o quelle di preadipociti umani del tessuto connettivo adiposo bianco.
13. Uso della fibroina per la produzione di un substrato secondo le rivendicazioni precedenti, il detto substrato essendo adatto allo sviluppo, alla proliferazione ed alla corretta differenziazione di cellule tissutali specializzate del corpo umano.
14. Uso della fibroina secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che le cellule tissutali del corpo umano comprendono quelle della pelle, le cellule mesoteliali, gli astrociti, gli osteoblasti umani dello scheletro, i tenociti o fibroblasti umani, i condrociti o le cellule isolate dal tessuto cartilagineo, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, le cellule steroidosecernenti della corteccia surrenalica, le cellule muscolari lisce della tonaca muscolare dell'intestino e dei vasi sanguigni, le cellule dell'epitelio squamoso del cavo orale o della congiuntiva/cornea, e/o quelle di preadipociti umani del tessuto connettivo adiposo bianco.
15. Procedimento per la produzione di un substrato secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che seta sgommata viene disciolta in una

5

soluzione di bromuro di litio in acqua ad una temperatura superiore a quella ambiente ed a pressione standard, che la soluzione così ottenuta viene poi filtrata su un setto poroso di ceramica e diluita con acqua distillata e successivamente analizzata e lasciata evaporare in contenitori di polistirene, e dal fatto che la membrana così ottenuta viene immersa in una soluzione di metanolo e acqua per renderla cristallina ed insolubile in acqua.

IL MANDATARIO
(Ing. Sandro Sandri)



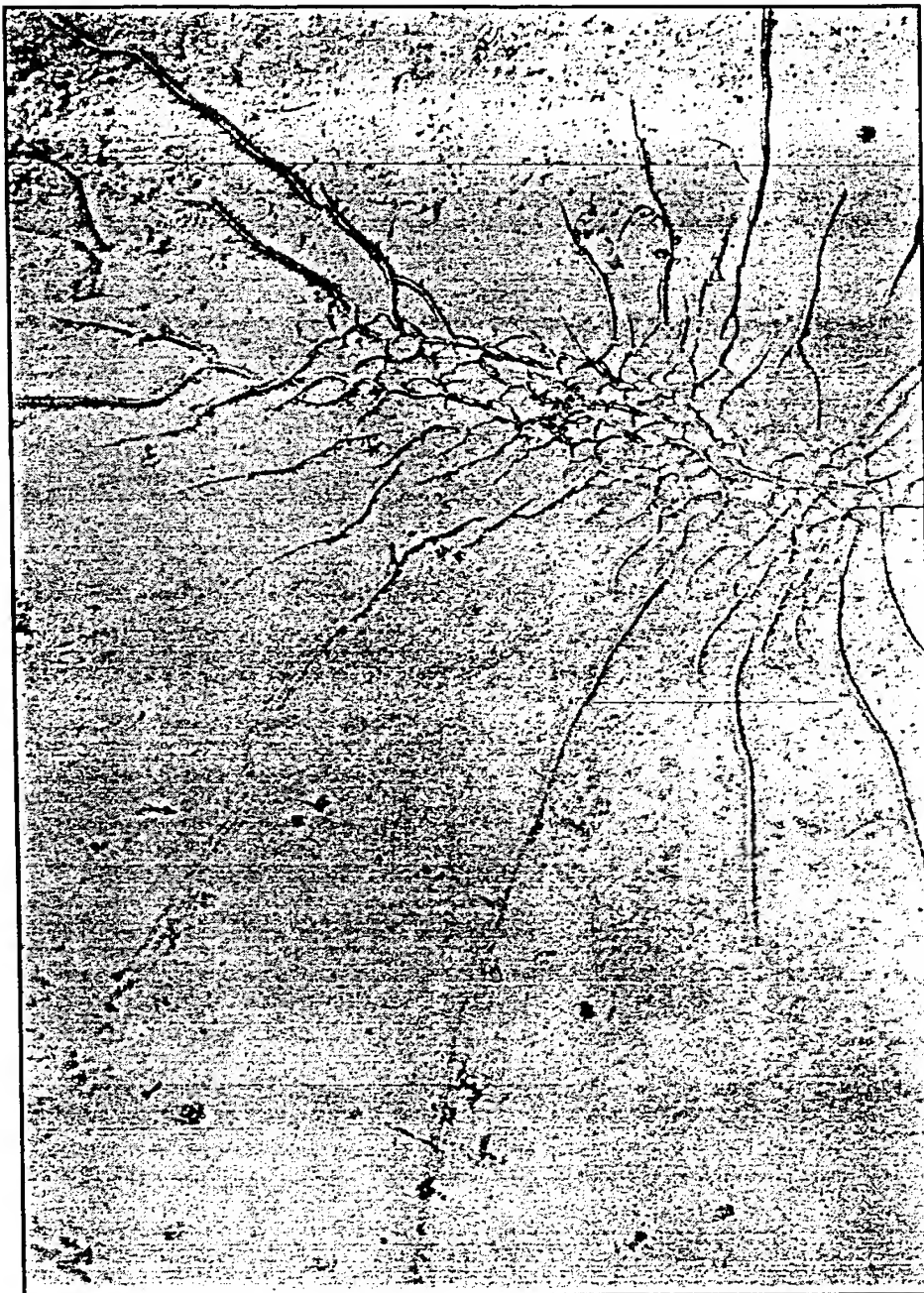
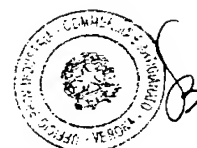



Fig. 1



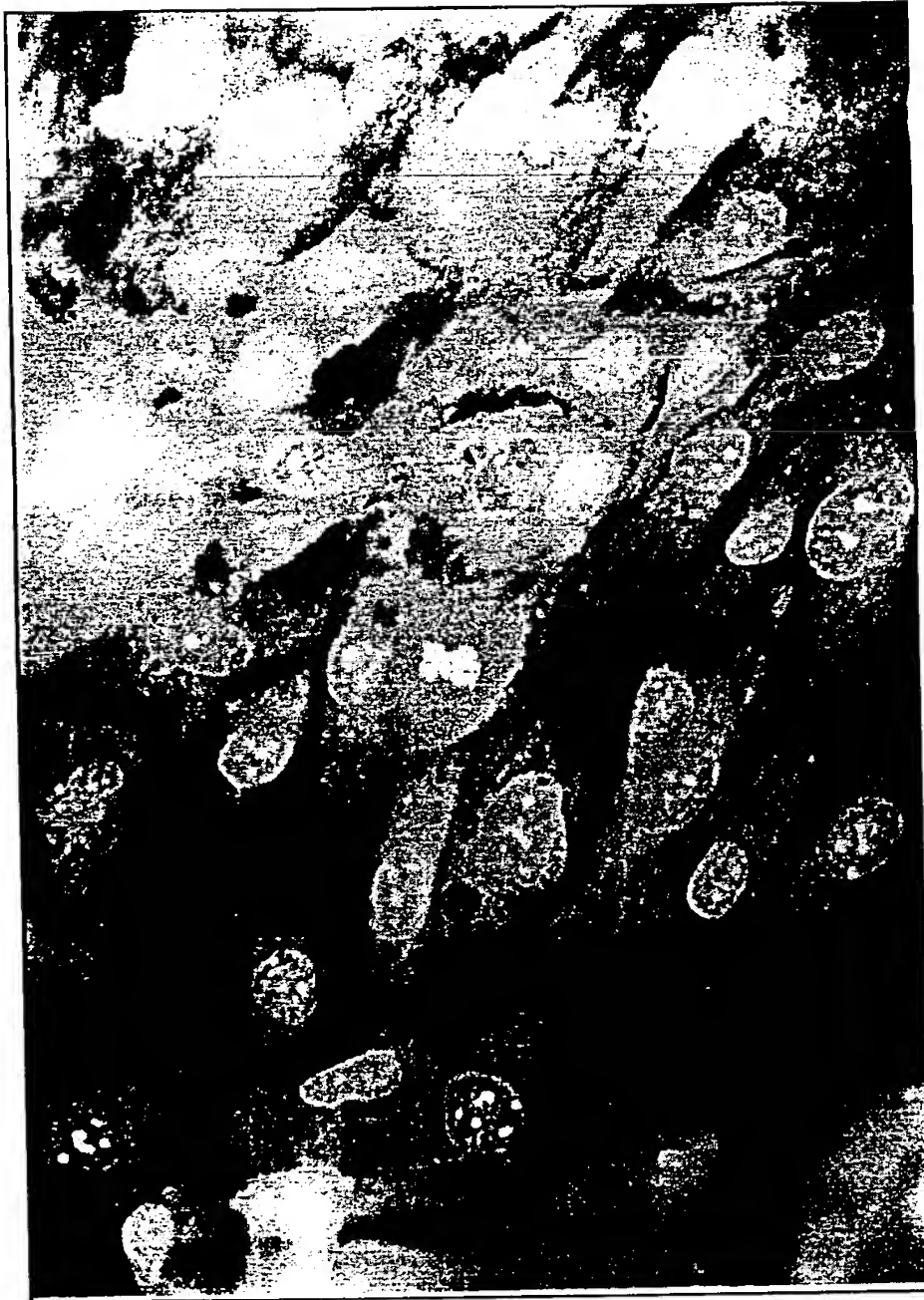
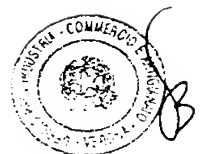


Fig. 2



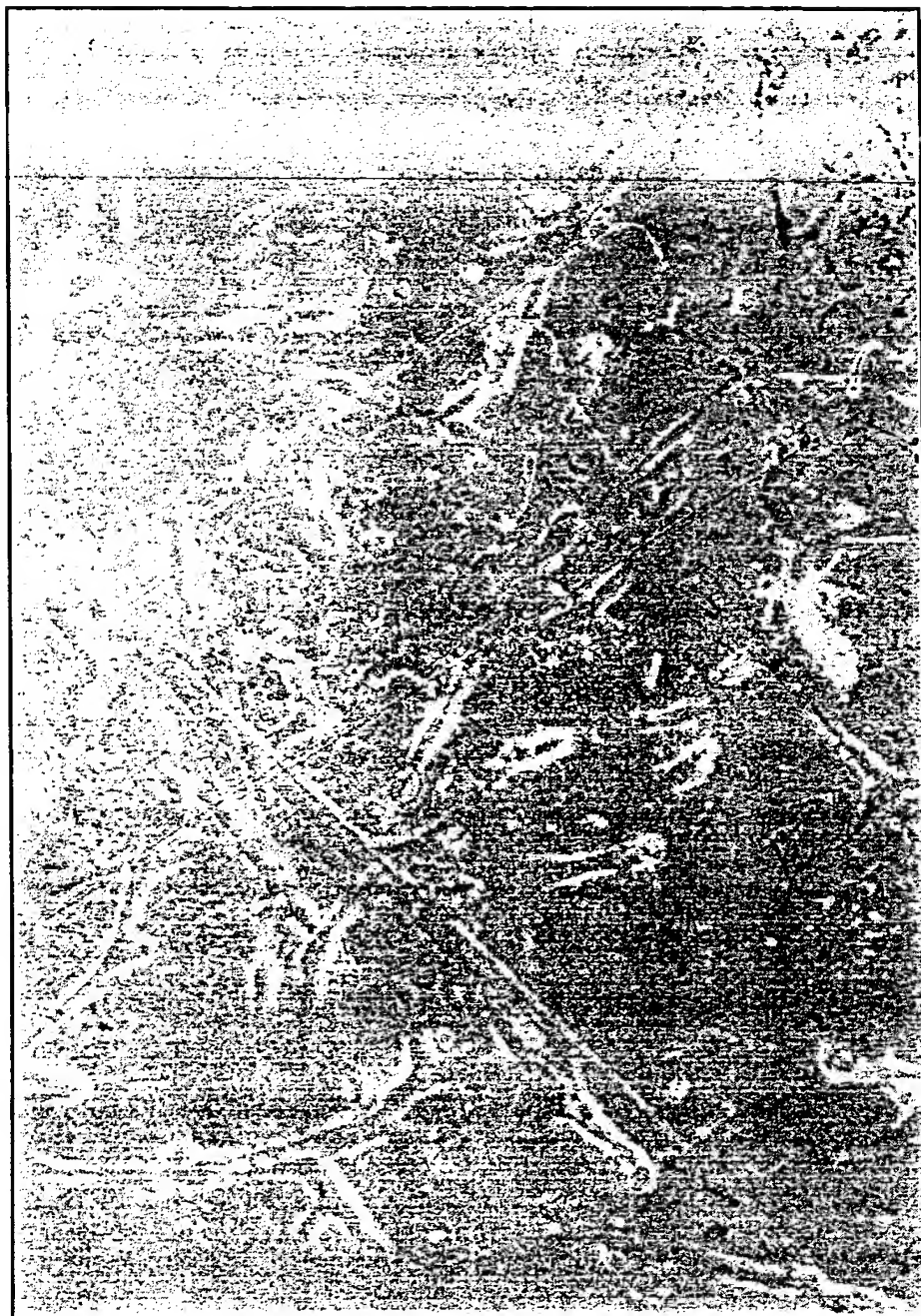
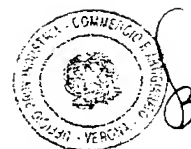


Fig. 3



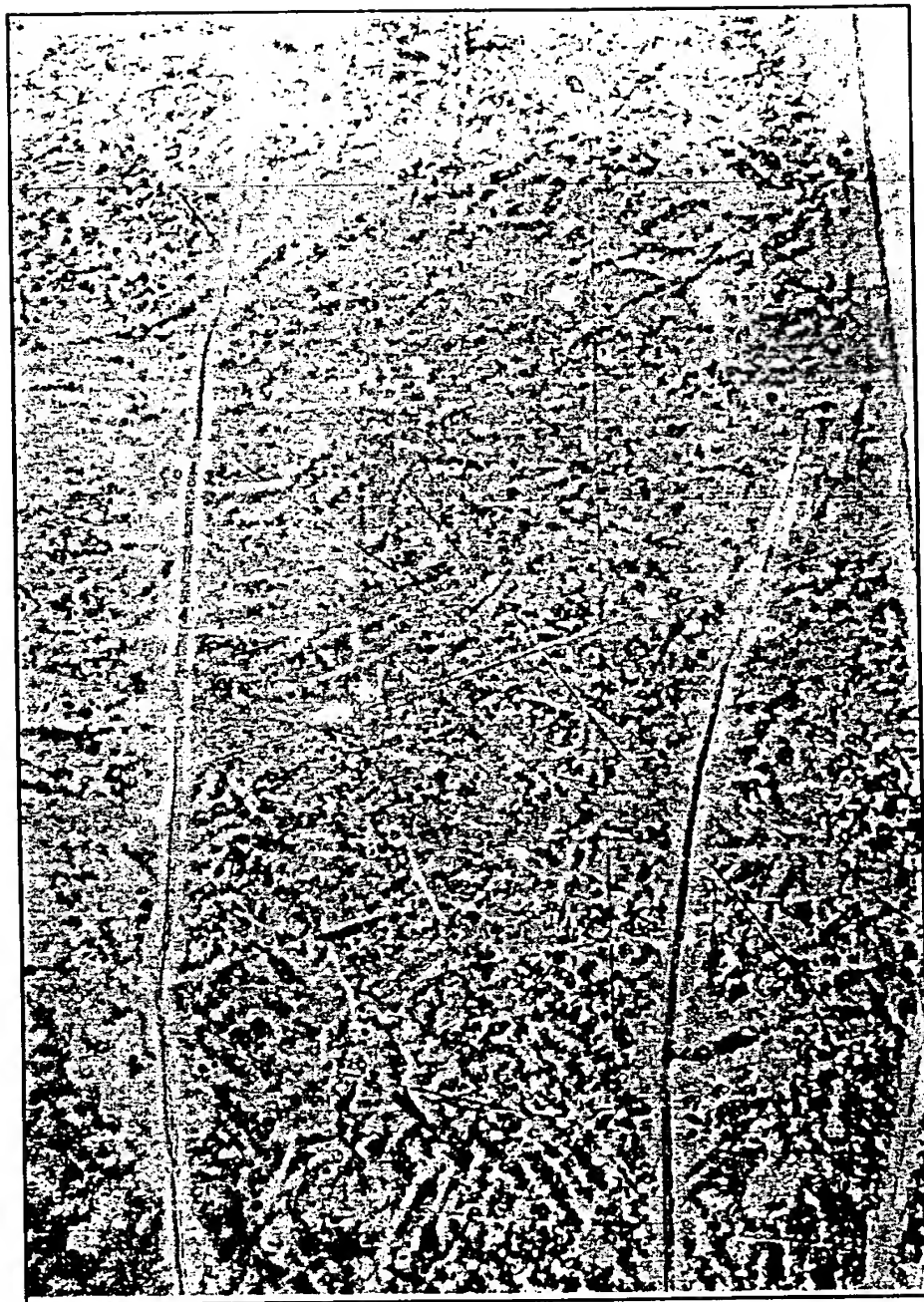
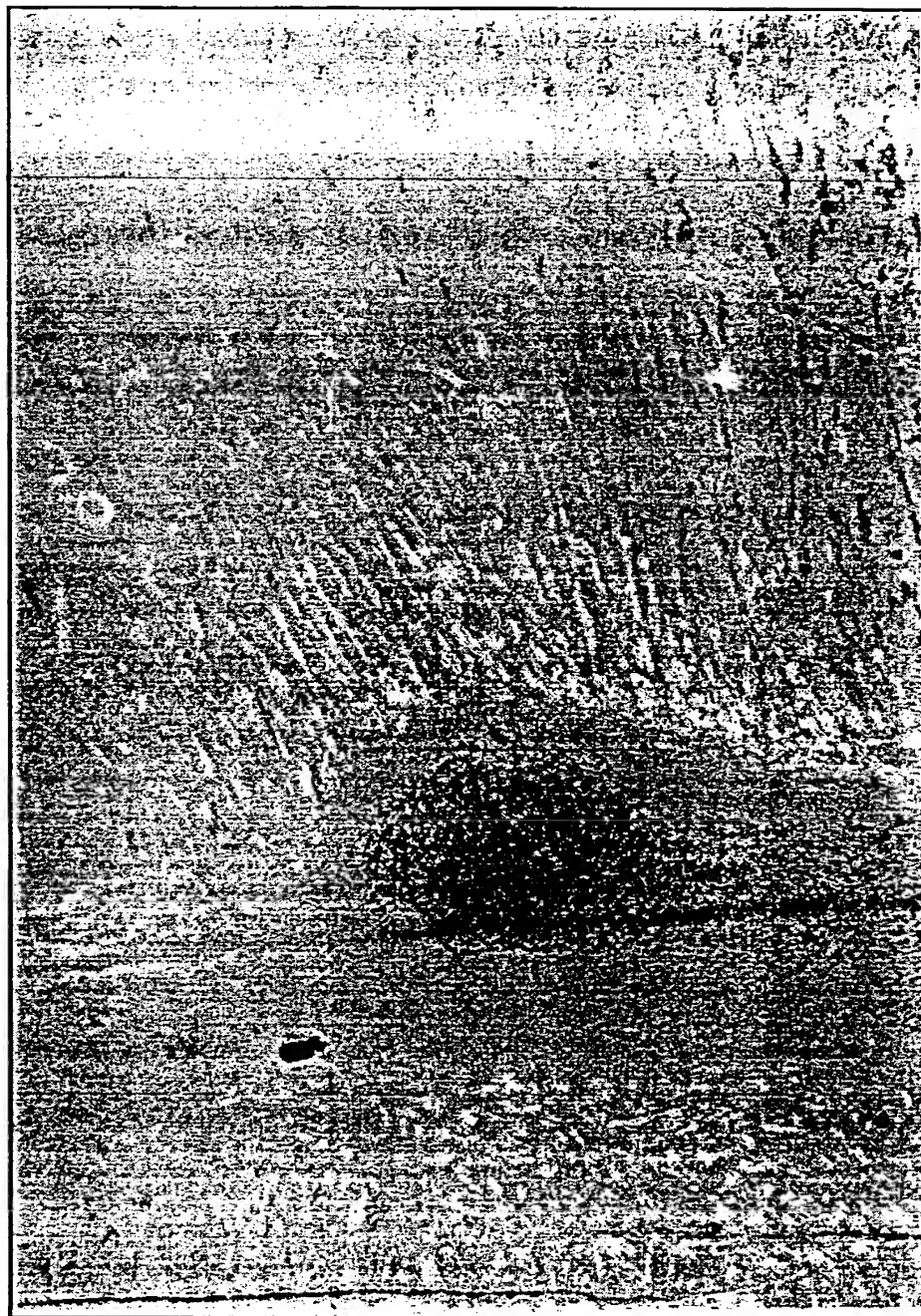


Fig. 4



Fig. 5

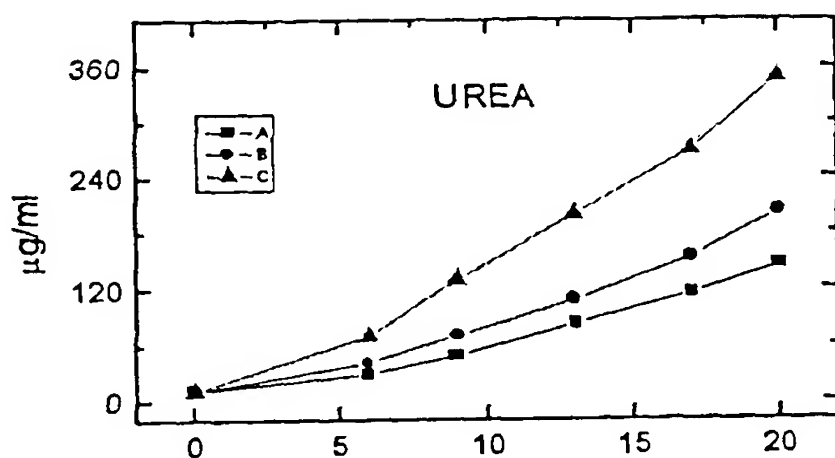


Fig. 6

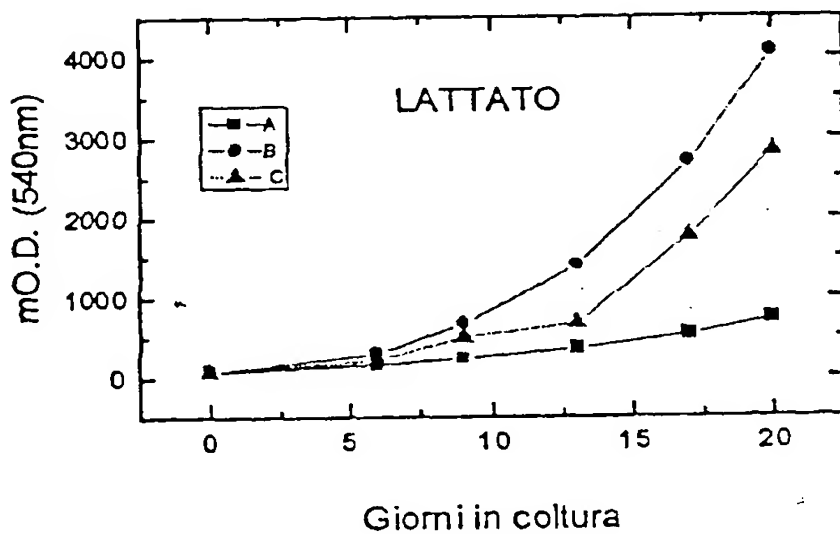
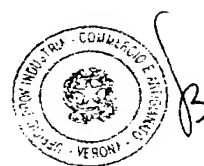


Fig. 7



7/21

EUROPATENT sas
ing. S. Sandri
Ns. rif.: 091/99

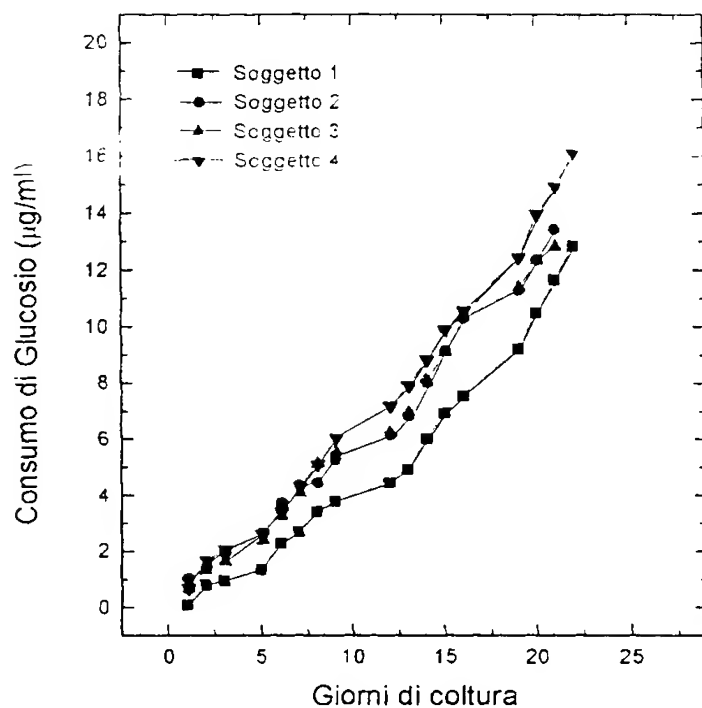


Fig. 8

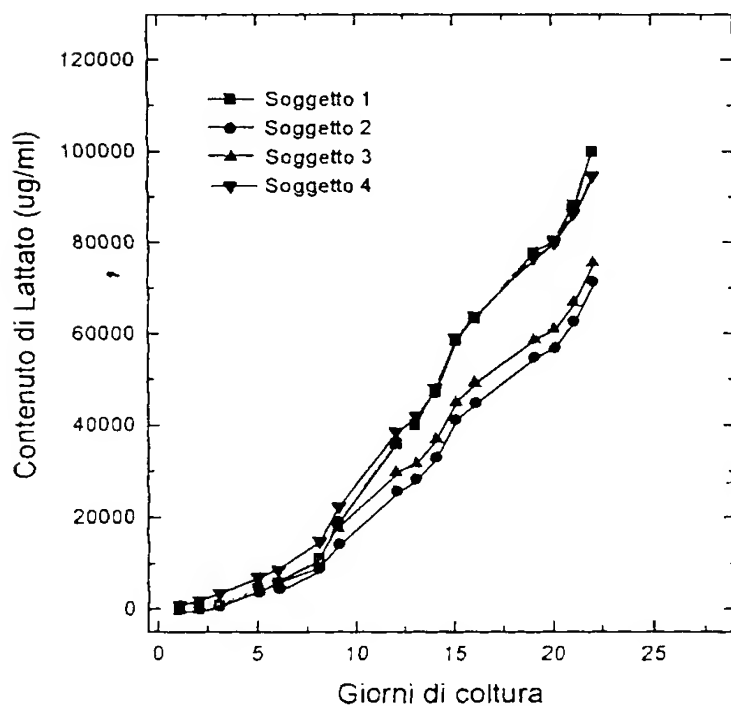
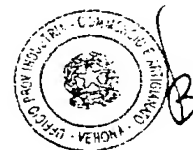


Fig. 9



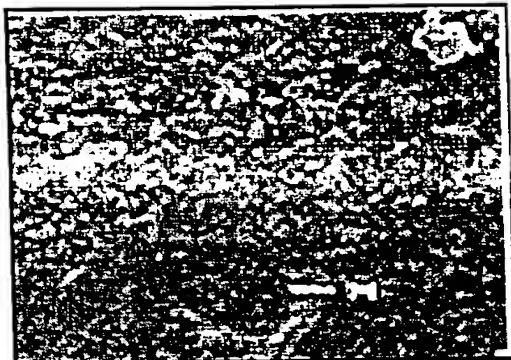


Fig. 10

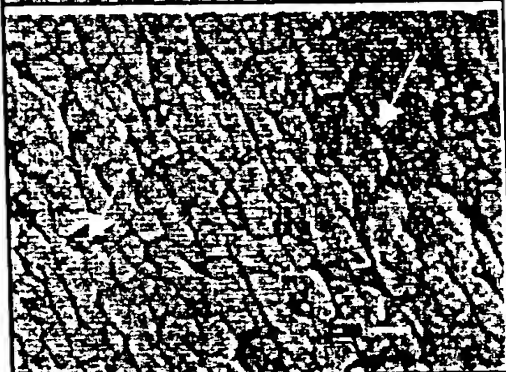


Fig. 11



Fig. 12

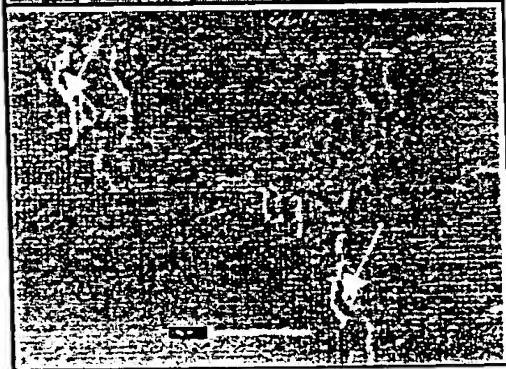


Fig. 13

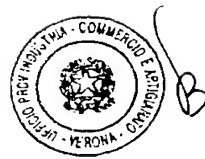




Fig. 14



10/21

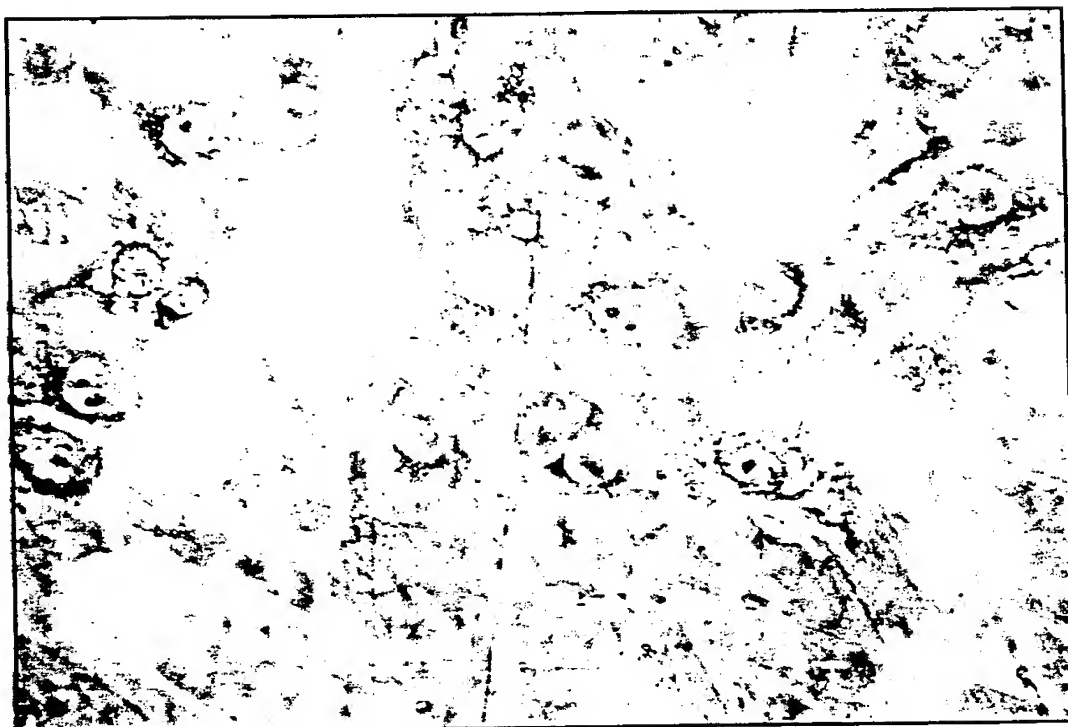


Fig. 15



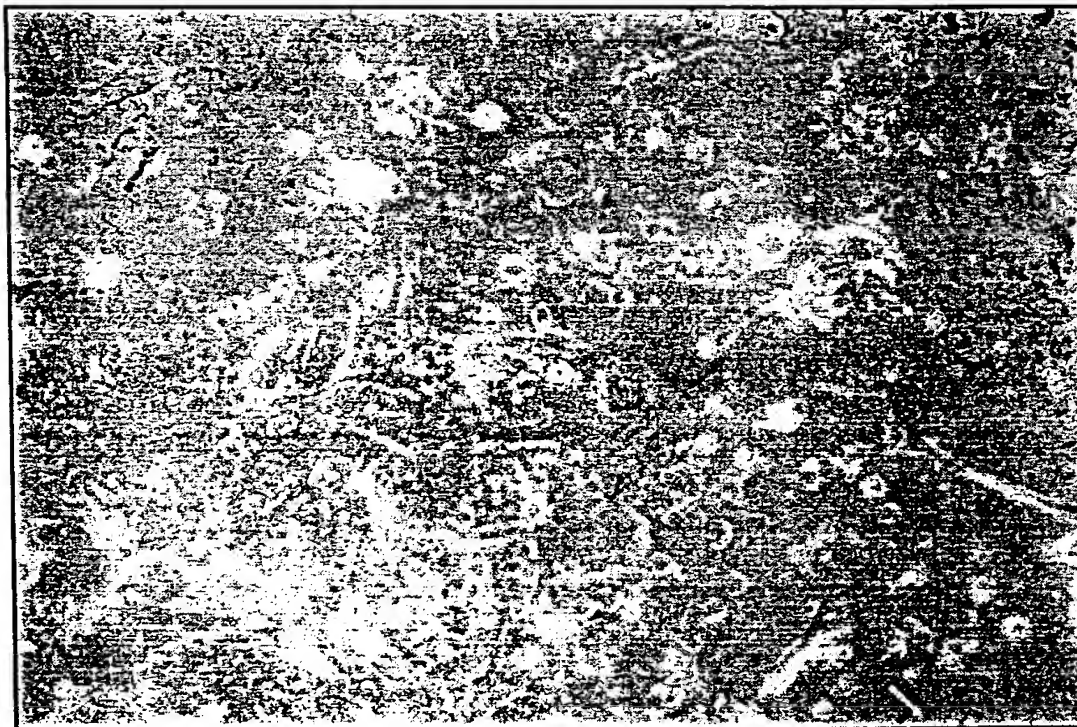


Fig. 16



VR99A000082

12/21

EUROPATENT sas
ing. S. Sandri
Ns. rif.: 091/99

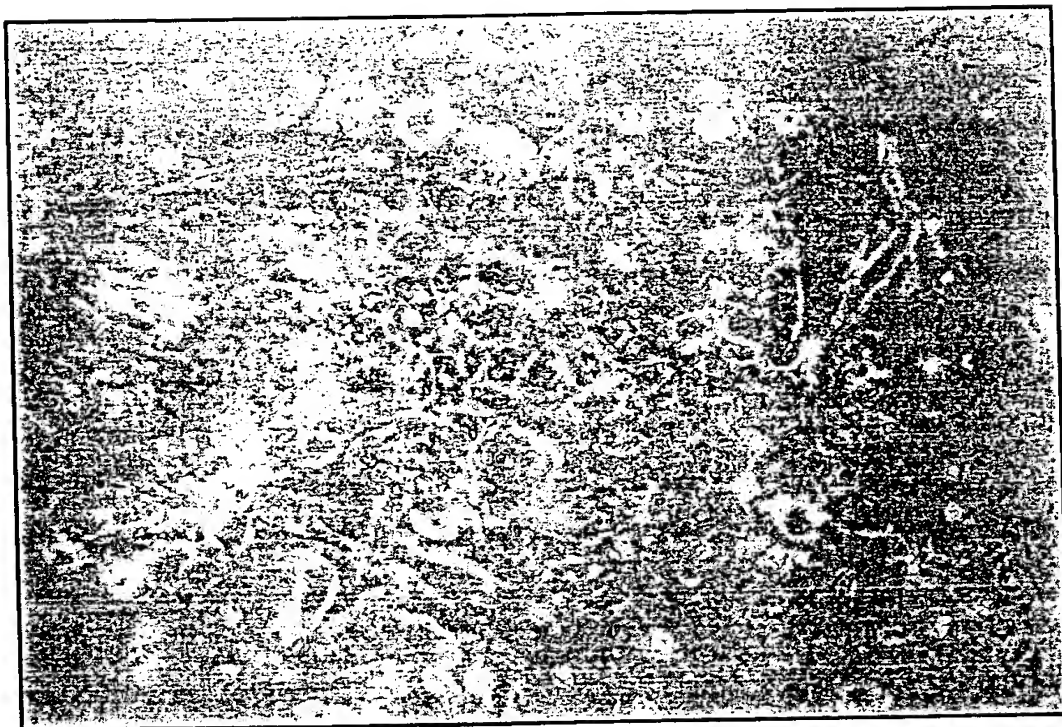


Fig. 17

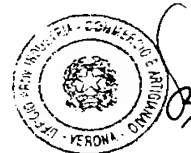




Fig. 18



0899.4000082

14/21

EUROPATENT sas
ing. S. Sandri
Ns. rif.: 091/99

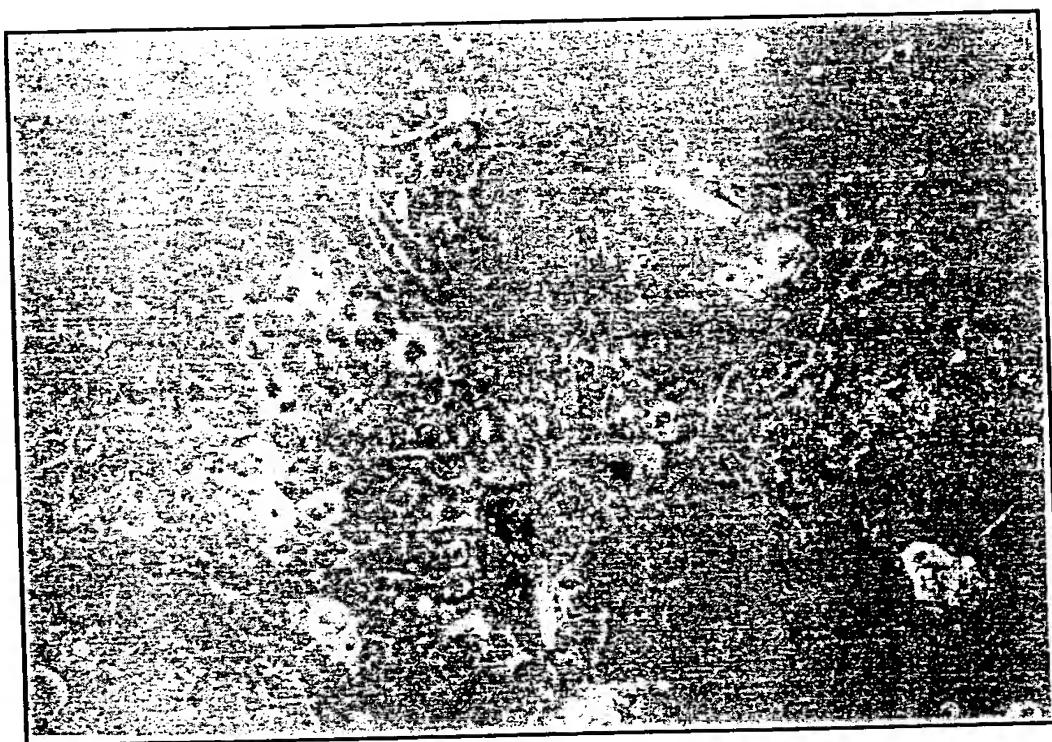
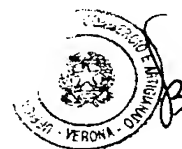


Fig. 19



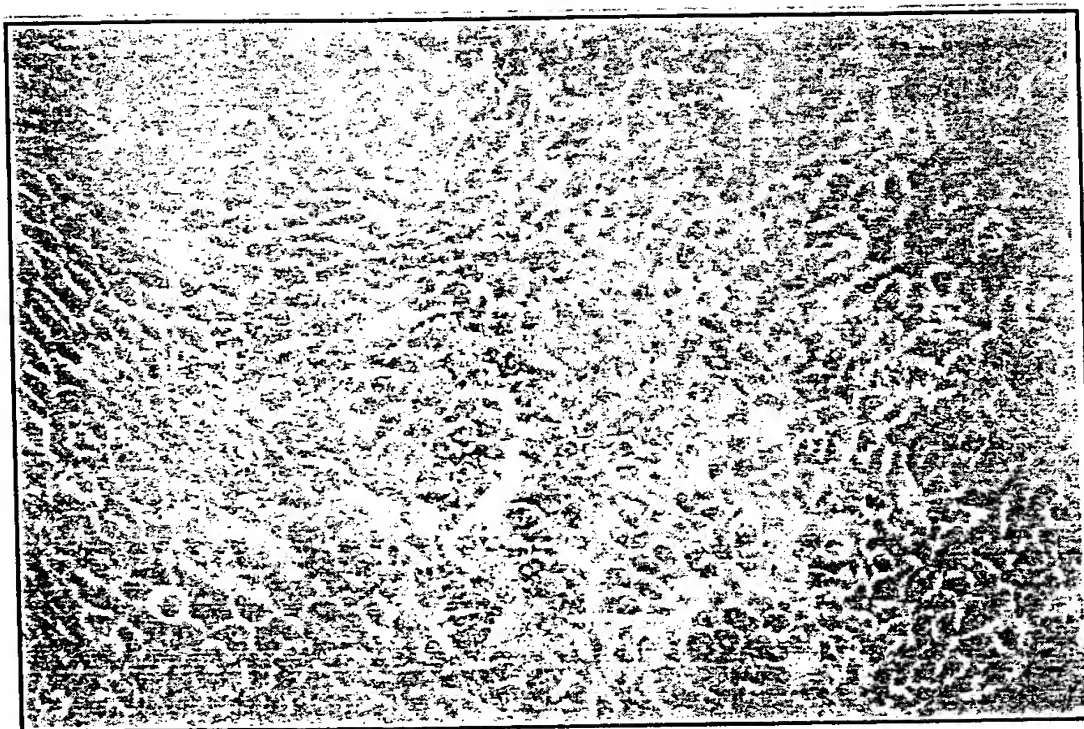


Fig. 20

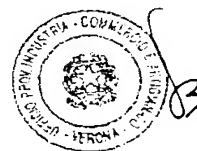
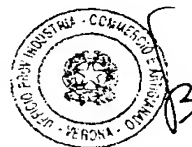




Fig. 21



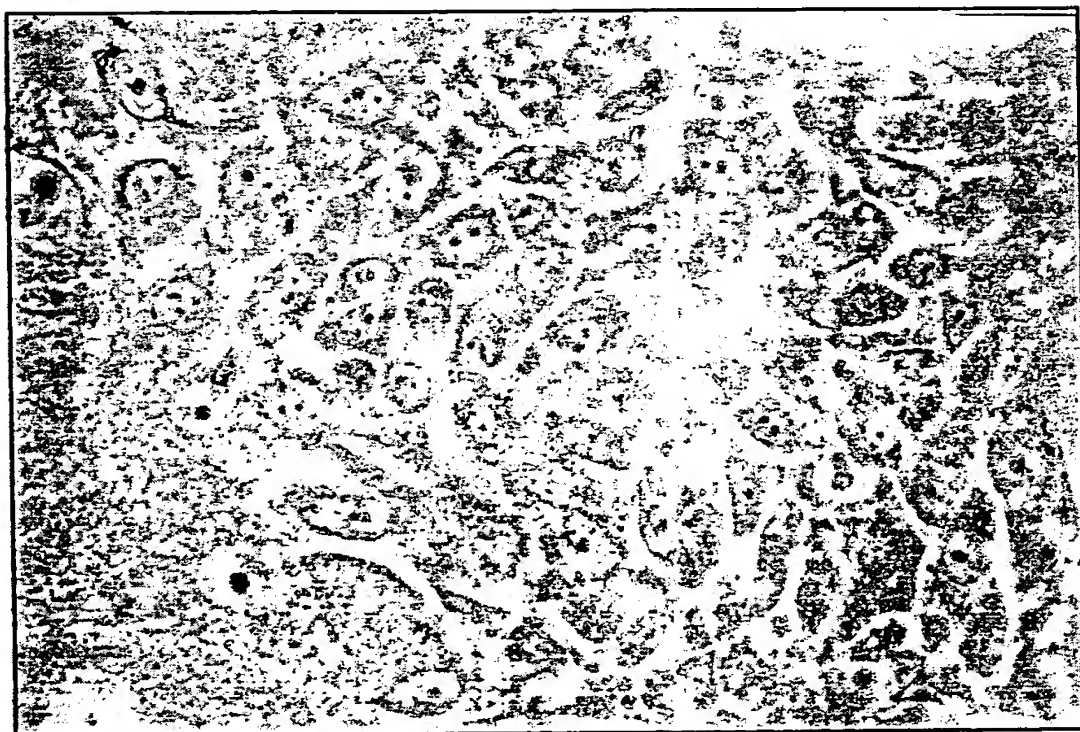
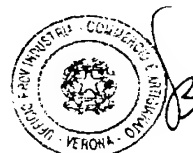


Fig. 22



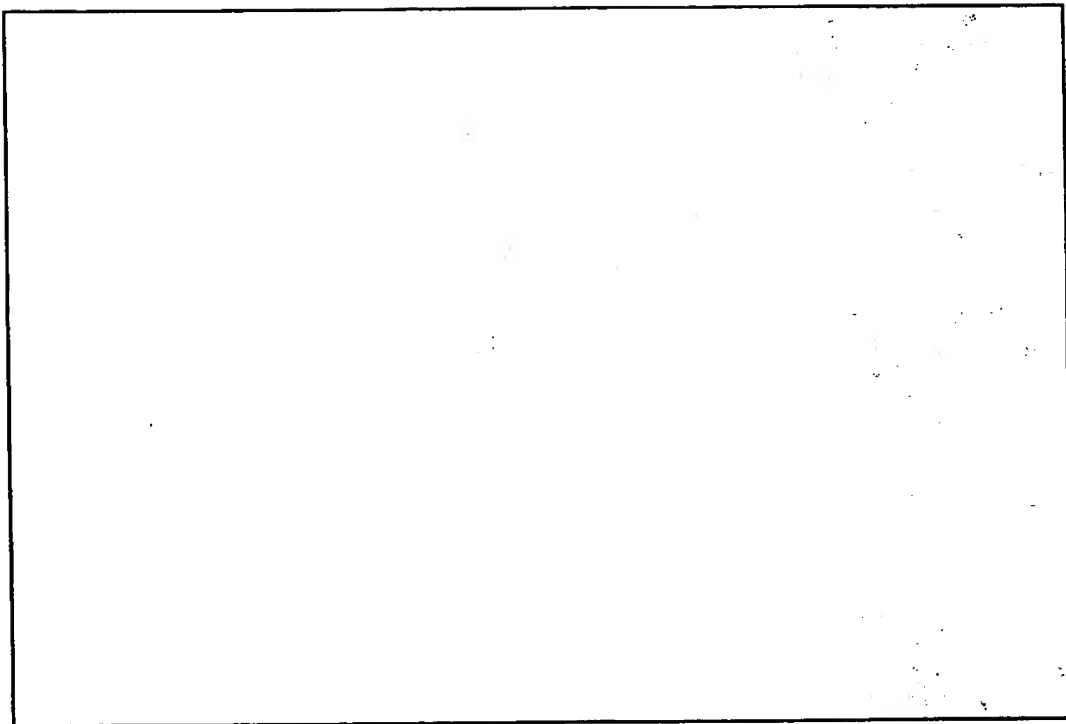
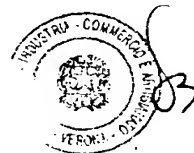


Fig. 23



UR99 4000082

19/21

EUROPATENT sas
ing. S. Sandri
Ns. rif.: 091/99

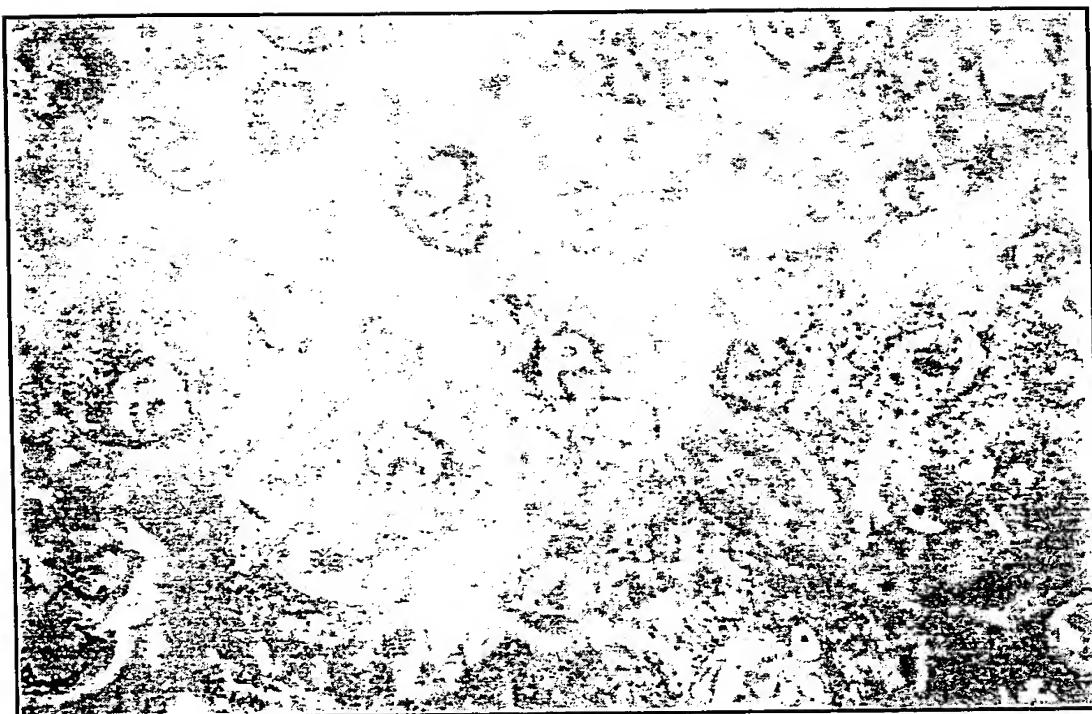


Fig. 24



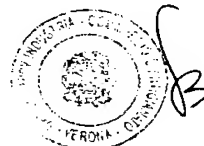
UR99A000082

20/21

EUROPATENT sas
ing. S. Sandri
Ns. rif.: 091/99



Fig. 25



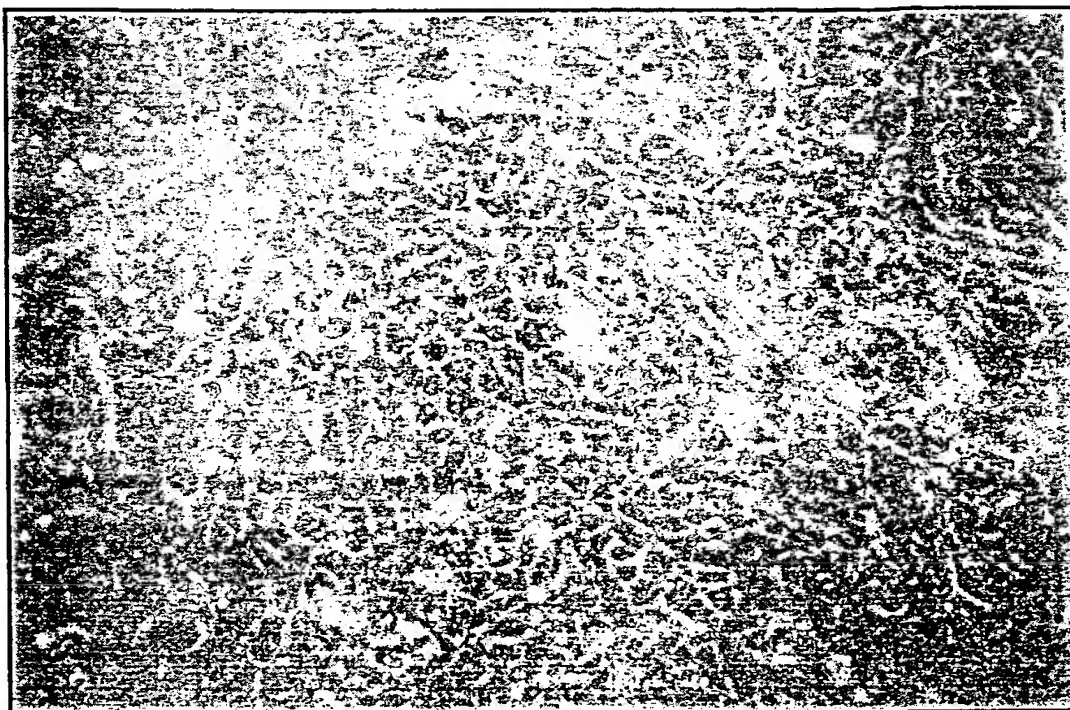


Fig. 26

